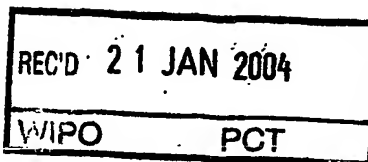


Rec'd PCTO 24 JUN 2005



REPÚBLICA DE CUBA



Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora de la OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número treinta y uno del año dos mil tres del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Patente de Invención, por **ANTÍGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A OBTENIDOS EN CÉLULAS VEGETALES**, con fecha treinta y uno de enero de dos mil tres, a las nueve horas y veinticinco minutos ante meridiano, por Mariela Vázquez Castillo, Agente Oficial, ciudadana cubana, a nombre y en representación del CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA, cuya invención fue creada por Guillermo Selman-Housein Sosa; Rolando García González; Alina López Quesada; Beatriz González Badillo; Abel Hernández Velásquez; Javier Ríos Bacallao; Yamilka Rosabal Ayon; Marlen Pérez Martínez y Licel Rodríguez Lay.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Patente de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, Lista de Secuencias, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Mariela Vázquez Castillo, Agente Oficial, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los veintiséis días del mes de diciembre de dos mil tres.


Ing. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

RESUMEN

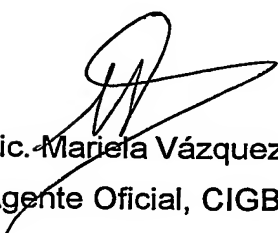
ANTIGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A OBTENIDOS EN CELULAS VEGETALES.

5

Generación de construcciones genéticas basadas en fragmentos modificados del genoma del virus de la hepatitis A (VHA), utilizando la cepa M2, aislada en Cuba. Las secuencias nucleotídicas de estos fragmentos fusionados a señales de localización y de regulación apropiadas se expresan en plantas transgénicas, dando

10 lugar a antígenos recombinantes del VHA, compuestos por pentámeros y/o envolturas vacías, capaces de generar una respuesta inmune.

15


Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB



MEMORIA DESCRIPTIVA

ANTIGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A OBTENIDOS EN CELULAS VEGETALES.

5

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con la rama de la biotecnología y más específicamente con la expresión de proteínas recombinantes en plantas transgénicas y su uso como antígenos vacunales. En particular se proporcionan antígenos recombinantes del virus de la hepatitis A obtenidos en plantas transgénicas a partir de la expresión de fragmentos modificados del genoma del virus HAV de la cepa M2 aislada en Cuba. Se demuestra además la utilidad de los mismos para desarrollar respuesta inmune en animales luego de serle administrados estos por diferentes vías.

Arte Previo

15 **El Virus de la Hepatitis A.**

El genoma del VHA es ARN de simple cadena y polaridad positiva de aproximadamente 7.5 kb que codifica para una poliproteína de 253 kDa. (Cohen, J. I. y cols., Journal of Virology (1987), 61:3035-3039). La poliproteína sufre procesos co y post-traduccionales, dando lugar a proteínas maduras estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4 Y 2A) y no estructurales (2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D).

La proteasa 3C (P_{ro}3C), presente en el dominio P3 de la poliproteína viral, es la proteasa que interviene en el clivaje de la poliproteína del VHA (Martín y cols., J Virol. (1999), 73(8):6220-7), permitiendo la liberación de los intermediarios P1-2A, 2BC y P3, los cuales son procesados posteriormente. Por lo tanto para que se formen adecuadamente las envolturas y ocurra la replicación del VHA es necesario que ocurra un procesamiento proteolítico diferencial de la poliproteína del VHA. Durante el procesamiento de la región P3 solamente la unión 3C/3D es eficientemente cortada y existe un procesamiento retardado en los sitios 3A/3B y/o 3B/3C permitiendo la acumulación del polipeptido intermediario 3ABC (Kusov y cols., Journal of Virology (1999), 73:9867-9878), el cual corta el polipéptido P1-2A con similar eficiencia que la proteasa 3C propicia una mayor eficiencia en la formación de los pentámeros. La forma característica del virus proviene de la unión de las proteínas virales, y su configuración tridimensional es importante para la generación de una respuesta inmunológica protectora. El virión del VHA presenta un

sitio antigénico de neutralización inmunodominante que está estrictamente conservado entre cepas del VHA aisladas de diversas áreas geográficas. Está formado por cinco epitopes conformacionales, tres de ellos en los pentámeros y dos que se forman una vez ensamblados los pentámeros para formar las envolturas. Se plantea que estos últimos epitopes se forman por cambios conformacionales en el sitio antigénico o por yuxtaposición de fragmentos de epitopes presentes en los pentámeros durante el ensamblaje de estos. Tanto los pentámeros como las partículas virales inducen anticuerpos neutralizantes y por tanto pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas (Stapleton y cols., *Journal of Virology* (1993), 67:1080-1085). Utilizando *Baculovirus* recombinantes que contenían el marco de lectura completo del VHA se expresó la poliproteína gigante del VHA además de otras proteínas intermediarias del procesamiento de esta en células de insectos (Stapleton y cols., *The Journal of Infectious Diseases* (1995), 171:9-14). También se construyeron virus *vaccinia* recombinantes, los cuales expresaron esta misma poliproteína del VHA en células de mamífero. Los extractos de células infectadas con estas construcciones genéticas mostraron que ocurría un procesamiento post-traducciona l de la poliproteína dando lugar a envolturas similares a las del VHA (Winokur y cols., *Journal of Virology* (1994), 65:5029-5036). Existen patentes que describen variantes de vacunas recombinantes contra VHA expresadas en sistemas de *baculovirus* y *vaccinias*, tales como: solicitud de patente No WO9301279 Winokur y cols; 21 de Enero de 1993.; patente No US5294548 (McLinden y col., marzo 1994); solicitud de patente WO09844122 (Probst, August 27, 2002); solicitud de patente WO9111460 y patente US5605692 (Thomas y col., 25 de Febrero de 1997), donde se utilizan las secuencias del marco de lectura abierto completo (MLA) para la producción de envolturas y pentámeros inmunogénicos y se reivindican los métodos para la obtención de envolturas del VHA, expresando las regiones estructurales y la región P3 en una orientación cis, trans y en construcciones bicistronicas.

30 **Plantas transgénicas como biorreactores.**

Las primeras plantas transgénicas originadas a partir de la transferencia de genes mediada por la rizobacteria *Agrobacterium tumefaciens* se produjeron a principios de la década de los 80 (Zambryski y cols, *EMBO J.* (1983), 2: 2143-2150), empleándose esta tecnología inicialmente como una forma de lograr la resistencia a

microorganismos patogénicos (Powell y cols., Science (1986), 232: 738-743), a insectos (Vaeck y cols., Nature (1987), 328: 33-37), y a herbicidas (De Block y cols., 1987, EMBO J. 6: 2513-2518). Pero la demostración de la capacidad de las células vegetales de ensamblar correctamente proteínas foráneas de una alta complejidad

5 estructural indicó rápidamente su posible valor como una nueva estrategia de escalado para la producción económica de proteínas recombinantes de interés industrial y biofarmacéutico (Barta y cols., Plant Mol. Biol (1986), 6: 347-357; Cramer y cols., Ann. N Y Acad. Sci. (1996), 792: 62-71; Staub y cols, Nature Biotechno. (2001). 18: 333-338).

10 En 1992, se introdujo un nuevo concepto en la producción de vacunas de subunidades debido a la demostración de que plantas transgénicas podían expresar el antígeno de superficie de hepatitis B (AgshB). En las bases de esos hallazgos se pensó en la idea que las plantas podrían ser usadas para producir candidatos vacunales en tejidos comestibles y lograr inmunizar solamente consumiendo estos

15 tejidos, de esta forma aparece la denominación de "vacunas comestibles" (Arntzen y cols., Plants.Vaccine (1994), 94:339-344. Posteriormente se demostró que ratones alimentados con papas transgénicas conteniendo el AgshB mostraron una respuesta inmune primaria que es similar a la que se obtiene cuando se administra una dosis única de la vacuna comercial intraperitonealmente, indicando que la

20 expresión de antígenos en tejidos comestibles de plantas puede ser considerada como una nueva vía de inmunización (Richter y col., Nature Biotechnology (2000), 18:1167-1171).

Existen varias patentes que describen el uso de las plantas para la expresión de vacunas, tales como: patente No US5484719 (Lam y col., Enero 16, 1996); patente

25 No US5612487 (Lam y col., Enero 16, 1996); patente No US5914123, divisional de la patente No US5612487 y continuación en parte de la solicitud de patente No PCT/US94/02332 (Arntzen y col. Junio 22, 1999); patente No US6136320 (Arntzen y col. Junio 22, 1999); solicitud de patente WO9612801 (Arntzen y col. mayo 28, 2002) y la solicitud de patente No US2002006411 (Lam y col. 4 de Junio, 2002).

30 Los documentos anteriormente señalados describen además del uso de las plantas como vacunas, la expresión del AgshB en plantas y en algunos casos utilizan el termino "hepatitis viral" para referirse al virus de la hepatitis B (VHB). El VHB difiere significativamente del virus de la hepatitis A con características muy diferentes y por tanto pertenecen a distintos géneros desde el punto de vista taxomónico. Para

lograr proteínas recombinante del VHA capaces de levantar una respuesta inmunológica importante es necesario expresar varias proteínas del genoma viral y luego lograr que se formen partículas tales como pentámeros o envolturas vacías. El procesamiento y la formación de partículas inmonogénicas, solamente se ha

5 logrado en sistemas eucarioticos como vaccíneas y baculovirus y no en sistemas más sencillos como en levaduras. En plantas transgénicas no se han expresados antígenos con la complejidad del VHA. En el caso del VHB, el antígeno está formado por una sola proteína y es particulado eficientemente en sistemas eucariotico simples, como levadura. Por lo anteriormente expuesto creemos que la

10 expresión del AgsHB no abarca la expresión de pentámeros o envolturas vacías del VHA en plantas. En otras solicitudes de patentes se describen específicamente la expresión de diferentes antígenos virales, tales como el del virus del papiloma humano en la solicitud de patente No WO0161022 de Sohn y col. del 23 de agosto del 2001; el del virus de la fiebre aftosa en la solicitud de patente No CN1319670 de

15 Zhong y col. del 31 de octubre del 2001; de los rotavirus en la solicitud de patente WO0159070 de Lee y col. del 16 de Agosto del 2001 y el del virus del gumboro en la solicitud de patente No WO0197839 de Shachar y col. del 27 de Diciembre del 2001.

La producción de proteínas recombinantes en plantas ofrecen muchas ventajas

20 potenciales para generar compuestos farmacéuticos o vacunas de importancia en la medicina clínica. En primer lugar, los sistemas vegetales son más económicos que la infraestructura industrial utilizada en sistemas de fermentación o en biorreactores. En segundo lugar, ya está disponible la tecnología para cosechar y procesar plantas y sus productos a escala industrial. En tercer lugar, el requisito de la purificación del

25 compuesto puede ser eliminado cuando el tejido de la planta que contiene la proteína recombinante se utiliza como alimento (como en el caso de las vacunas comestibles). En cuarto lugar, se puede dirigir las proteínas recombinantes a determinados compartimientos intracelulares (como mitocondrias, vacuolas, cloroplastos y retículo endoplasmático), o expresarlos directamente en esos

30 compartimientos (como por ejemplo el cloroplasto). En quinto lugar los riesgos a la salud que se presentan por posible contaminación del producto recombinante con patógenos humanos son mínimos. Finalmente las plantas como sistema de expresión de proteínas recombinantes de importancia farmacéutica tienen como ventaja además que muchos de los pasos de la vía secretora, incluyendo

plegamiento, ensamblaje, glicosilación al nivel de retículo endoplasmático son similares a las células de mamíferos (Ma y Hein, , Plant Physiol. (1995), 109: 341-346; Rayon y cols., J. Exp. Bot. (1998), 49: 1463-1472.; Sanderfoot y Raikhei, Plant Cell. (1999), 11: 629-641; Vitale y Denecke, Plant Cell (1999), 11: 615-628; Lerouge y cols., Pharmaceutical Biotechnology (2000), 1: 347-354).

Descripción detallada de la invención

El diseño base del objeto de esta invención se apoya en construcciones genéticas que permiten la expresión combinada de genes que codifican para diferentes variantes de proteínas estructurales y regiones no estructurales mutadas, dirigidas a la expresión recombinante en plantas transgénicas de pentámeros y envolturas antigénicas del VHA capaces de generar una respuesta inmune.

La novedad de nuestra invención radica fundamentalmente en las regiones del genoma viral que se emplean para la conformación de un marco de lectura abierto nuevo que codifica para una poliproteína de tamaño menor, conformada por las regiones estrictamente estructurales (solamente hasta la proteína 2A) y la proteasa viral modificada, la cual presenta una talla superior a la proteasa 3C del virus debido a que los sitios de cortes entre las proteínas 3A/3B y 3B/3C están mutados. La expresión de envolturas virales y pentámeros del VHA en el citosol y en el retículo endoplasmático de plantas transgénicas se logra por primera vez, significándose la efectividad de las señales promotoras y reguladoras para la expresión de estas en plantas. La formación de pentámeros y envolturas en el retículo endoplasmático producto de la expresión combinada de la región estructural y la región responsable de la proteólisis demuestra las posibilidades de este compartimiento para el ensamblaje y el almacenamiento de estructuras complejas, como es el caso del VHA. La producción de pentámeros y envolturas en plantas nos permite la posibilidad del empleo de estas como biorreactores para la obtención de una vacuna barata y segura.

La invención está demostrada mediante los ejemplos en los cuales se usaron plantas transgénicas de tabaco, arroz y zanahoria para la obtención por primera vez de envolturas y pentámeros inmunogénicos del virus en células vegetales.

Las envolturas y pentámeros del HAV resultantes de la invención pueden ser usados como antígenos vacunales y además en ensayos diagnósticos para la detección de HAV.

Construcciones genéticas.

Obtención del cADN del VHA.

A partir del ARN de la cepa M2 del VHA aislada en Cuba, se amplificó la secuencia nucleotídica que codifica para el marco de lectura abierto (MLA) del virus, utilizando la técnica de Transcripción Reversa- Reacción en cadena de la Polimerasa (TR- RCP). Este fragmento se clonó en un plásmido y fue determinada su secuencia nucleotídica, la cual presenta diferencias que generan variaciones en 11 residuos aminoacídicos con respecto a las secuencias reportadas. El análisis de estas secuencias permite clasificar a la cepa M2 dentro del subgenotipo IA, al cual pertenecen casi la totalidad de las cepas americanas. A partir del genoma de esta cepa se diseñaron y construyeron fragmentos modificados que se utilizaron en las diferentes construcciones genéticas que son objeto de esta invención.

Construcciones genéticas de vectores para la expresión de envolturas y pentámeros en plantas transgénicas.

15 Proteasa recombinante de VHA.

Para que se formen las envolturas virales es necesario que ocurra un procesamiento proteolítico diferencial de la poliproteína, que permita la liberación ordenada de las proteínas virales. La eficiencia de la formación de la envoltura aumenta cuando el intermediario 3ABC está presente debido a la interacción hidrofóbica de la proteína 3AB con la membrana y las proteínas virales.

Para obtener un polipéptido 3ABC del cual no se libere la proteasa 3C y que a su vez conserve su función proteolítica, necesaria para formación de los pentámeros y envolturas del VHA, se mutaron los sitios de cortes de la proteasa 3C entre la proteínas 3A/3B, glutámico por valina y 3B/3C, serina por leucina respectivamente. Ese polipéptido se empleó en el diseño de novedosas y diferentes estrategias para la expresión de las proteínas del VHA formadoras de envolturas y pentámeros inmunogénicos.

VHA recombinante para la expresión de envolturas y pentámeros en el citosol de la célula vegetal. En el VHA, el polipéptido P1-2A tiene una función importante en la formación de la envoltura viral. En este polipéptido existen dos señales que regulan la formación de la envoltura. En el dominio carboxilo terminal de este polipéptido se encuentra la proteína 2A, que se requiere en las primeras etapas del ensamblaje de las envolturas para lograr la formación de los pentámeros a partir de la unión de cinco moléculas del polipéptido P1-2A aún sin procesar. La proteína

VP4 se requiere en una segunda etapa para la asociación de los pentámeros y la formación de las envoltura.

Para la expresión de la poliproteína modificada en el citosol de la célula vegetal, se construyeron vectores que contienen la secuencia del marco de lectura abierto modificado (MLAm), que codifica para una poliproteína significativamente menor que la poliproteína original del VHA. Esta secuencia es el resultado de la fusión de la secuencia que codifica para el polipéptido P1-2A y la secuencia que codifica para la proteasa 3ABC mutada.

El vector plasmídico utilizado para la transformación de plantas, mediante *A. tumefaciens* contiene secuencias de ADN que codifican para proteínas del VHA fusionadas a las secuencias nucleotídicas reguladoras de la expresión en plantas. En este caso la secuencia que codifica para la proteína no se encuentra fusionada a ninguna señal específica de transporte a través de la vía secretora de la célula vegetal, por lo que se expresa en el citosol de la célula

VHA recombinante para la expresión exclusivamente de pentámeros en el citosol de la célula vegetal. Como se ha descrito anteriormente la proteína VP4 como parte del polipéptido VP0 se requiere para la asociación de los pentámeros y la formación de las envolturas virales.

De la secuencia nucleotídica codificante para la poliproteína MLAm se eliminó el fragmento que codifica para la proteína VP4, dando lugar a una secuencia denominada Δ MLAm. Se construyó un vector plasmídico para la expresión en el citosol de la célula vegetal donde la secuencia nucleotídica que codifica para la poliproteína Δ MLAm se fusionó a las secuencias que regulan la expresión en plantas y se usó para la obtención de plantas transgénicas mediante la infección con *A. tumefaciens* de hojas de tabaco, arroz y zanahoria. La poliproteína expresada con esta construcción genética es de una talla significativamente menor y es capaz de procesarse y formar exclusivamente pentámeros virales inmunogénicos. El tamaño menor de los pentámeros con respecto a las envolturas permite lograr mayores niveles de expresión ya que provoca en la célula vegetal una menor carga metabólica. El producto obtenido es igualmente factible de ser empleado como inmunógeno para el desarrollo de vacunas.

VHA recombinante para la expresión de envolturas y pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.

La acumulación de proteínas heterólogas en el retículo endoplasmático en plantas, se logra mediante el uso de secuencias señales para dirigir estas a la vía secretora, y por tanto al retículo endoplasmático y de señales de retención en este organelo.

Se empleó como péptido señal, una secuencia que codifica para el péptido N-terminal de la esporamina del boniato. Como señal de retención de proteínas en el retículo endoplasmático se utilizó la secuencia que codifica para el péptido KDEL localizado en el extremo carboxilo de la proteína.

La secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido P1-2A, se fusionó en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y por su extremo 3' a la secuencia que codifica para un péptido espaciador unida a su vez a la secuencia que codifica para el péptido KDEL. El fragmento de ADN resultante se colocó bajo señales de regulación de la expresión en plantas y se clonó en un vector binario para su expresión en plantas. En este mismo vector binario se introdujo la secuencia que codifica para el polipéptido mutado 3ABC igualmente fusionado en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y en su extremo 3' a la secuencia que codifica para el péptido KDEL y bajo las señales de regulación para la expresión en plantas. Los dos polipéptidos se localizan en el retículo endoplasmático y la proteasa 3ABC es capaz de procesar el polipéptido P1-2A y lograr una eficiente formación de partículas.

VHA recombinante para la expresión exclusivamente de pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.

A la secuencia nucleotídica que codifica para el polipéptido P1-2A se le eliminó la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína VP4 y se obtuvo un polipéptido Δ P1-2A. Esta secuencia se fusionó en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y por su extremo 3' a la secuencia que codifica para un péptido espaciador unida a su vez a la secuencia que codifica para el péptido KDEL. En este mismo vector binario se introdujo la secuencia que codifica para el polipéptido mutado 3ABC igualmente fusionado en su extremo 5' a la secuencia que codifica para el péptido señal de la esporamina del boniato y en su extremo 3' a la secuencia que codifica para el péptido KDEL y bajo las señales de regulación para la expresión en plantas. Los dos polipéptidos se localizan en el retículo endoplasmático y la proteasa 3ABC es capaz de procesar el polipéptido Δ P1-2A y lograr la expresión de pentámeros exclusivamente. Estas

plantas exhiben mayores niveles de expresión y un mejor crecimiento y desarrollo, lo que conlleva a la obtención de mayor biomasa.

Identificación de las plantas transgénicas que expresan el producto de los genes del VHA modificado.

- 5 El *A. tumefaciens* se transformó con cada uno de los vectores binarios y se obtuvieron colonias bacterianas que contenían estos plásmidos. El *A. tumefaciens*, conteniendo las diferentes construcciones genéticas por separados, se utilizaron para la transformación de plantas y finalmente la obtención de plantas resistentes a la kanamicina como marcador de selección. La integración del ADN en las plantas
- 10 se comprobó por las técnicas de Southern blot y PCR .

A partir de hojas de plantas transgénicas se realizó la extracción de las proteínas solubles, macerando estas con nitrógeno líquido en un tampón de extracción de proteínas. Las envolturas y pentámeros se identificaron utilizando antisueros específicos al VHA y un anticuerpo monoclonal neutralizante, mediante el uso de

15 técnicas inmunoquímicas, tales como Western blot, Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) o Inmunomicroscopía, demostrándose que las plantas transgénicas expresan la poliproteína o en algunos casos los polipéptidos esperados y que estos son procesados y ensamblados en pentámeros o envolturas.

Las plantas que expresaron mayores niveles de proteína recombinante se utilizaron

20 para la purificación de las envolturas y los pentámeros utilizando para ello un anticuerpo monoclonal neutralizante.

Determinación de la inmunogenicidad de las envolturas y pentámeros purificados.

La inmunopotencia de las envolturas y pentámeros del VHA fueron determinadas

25 por la respuesta inmunológicas de los ratones, inmunizados con el producto purificado a partir de hojas de plantas de tabaco y arroz. y de ratones alimentados con zanahorias transgénicas que expresan el antígeno del VHA. Los métodos para la introducción del antígeno fueron la vía oral y parenteral. La respuesta inmune fue controlada y verificada utilizando la técnica de ELISA para determinar la reactividad

30 del antisuero del animal ante el VHA y por la capacidad del suero inmune de neutralizar el VHA infeccioso *in vitro*.

VENTAJAS DE LA INVENCION

Dentro de las ventajas más importantes que ofrece nuestra invención se encuentra: la similitud antigénica entre las envolturas y pentámeros purificados producto de la

expresión de nuestras construcciones y el virus original; los niveles de expresión de envolturas y pentámeros productos de las construcciones que reivindicamos son mayores en plantas que las obtenidas cuando se expresa el marco de lectura abierto del VHA o se coexpresa la región P1-2A y la región P3, ya que la poliproteína obtenida producto de la expresión de nuestras construcciones es de una talla significativamente menor a la del virus original; el polipéptido 3ABC, está compuesto exclusivamente por las proteínas 3A, 3B y 3C y tiene mutados los sitios de auto procesamiento entre las proteínas 3A/3B y 3B/3C, que evita que ocurra el procesamiento de este polipéptido y por lo tanto la función proteolítica de la poliproteína es asumida por el mismo con mayor eficiencia; los niveles de expresión de pentámeros y envolturas virales del VHA, en el retículo endoplasmático de la célula vegetal son mayores que en el citosol; la expresión exclusivamente de pentámeros en la célula vegetal es más eficiente y permite un mejor crecimiento y desarrollo de la planta, debido a que estas partículas son de menor tamaño; el escalado y producción de proteínas de uso farmacéutico a partir de plantas es factible para producir grandes cantidades de antígenos; los costos de producción disminuyen con relación a otros sistemas empleados y descritos en el estado del arte; la expresión en plantas del antígeno del VHA disminuye los riesgos de contaminación con patógenos que afectan a los seres humanos; la inmunización oral contra el VHA contribuye significativamente a abaratar los costos de la inmunización por la posibilidad de usar las plantas sin necesidad de purificar completamente el producto.

Depósito de microorganismos

Los plásmidos pBvHARE, p Δ VHARE, pBMLAm y p Δ MLAm fueron depositados bajo el Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos en el *Belgian Coordinated collection of Microorganisms BCCM, LMBP-COLLECTION* con número de acceso LMBP 4721; LMBP 4722; LMBP 4723 y LMBP 4724 respectivamente el 19 de mayo, 2003.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS.

Figura 1. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el citosol de la célula vegetal. A) Esquema del MLA de la cepa M2 del VHA. B) Esquema de las secuencias que codifican para las proteínas estructurales (P1-2A) C) Esquema de las secuencias que codifican para la región 3ABC. D) Esquema del

MLAm del VHA. E) Esquema del inserto de interés clonado en el vector binario para la expresión en plantas.

Figura 2. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el citosol de la célula vegetal. A) Esquema del Δ MLAm sin la secuencia que codifica para VP4.

5 B) Esquema del inserto de interés clonado en el vector binario para la expresión en plantas de Δ MLAm.

Figura 3. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal. A) Esquema de la secuencia P1-

10 2A fusionada a la secuencia KDEL. B) Esquema del inserto de interés clonado en el vector binario para la expresión en el retículo endoplasmático. E- Espaciador, K- KDEL

Figura 4. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal. A) Esquema de la secuencia P1-2A, sin la secuencia VP4 y fusionada a la señal KDEL. B) Esquema del inserto de interés

15 clonado en el vector binario para la expresión en plantas. E- Espaciador, K- KDEL

Figura 5. Southern blot de ADN genómico de plantas transgénicas de tabaco.

Figura 6. Southern blot de ADN de plantas transgénicas de zanahoria y arroz amplificado mediante RCP.

20 Figura 7. Western blot de proteínas de plantas transgénicas de tabaco, zanahoria y arroz, transformadas con construcciones genéticas para la expresión en citosols de envolturas y pentámeros.

Figura 8. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) realizado a las plantas de tabaco, zanahoria y arroz, transformadas con construcciones genéticas para la expresión en citosols de envolturas y pentámeros del VHA.

25 Figura 9. Inmunomicroscopía electrónica de una planta de tabaco, transformada con la construcción pBMLAm. A) planta no transformada. B) planta transformada. C) Planta transformada.

Figura 10. ELISA de inhibición de los sueros de ratones inmunizados por vía intraperitoneal con pentámeros del VHA purificados a partir de plantas de arroz y tabacos.

Figura 11. ELISA de inhibición de los sueros de ratones inmunizados oralmente con pentámeros del VHA purificados a partir de plantas de arroz y tabacos.

Figura 12. ELISA de inhibición de los sueros de ratones inmunizados oralmente mediante la alimentación de los mismos con zanahorias, cosechadas a partir de plantas que expresan pentámeros del VHA.

EJEMPLOS.

5 Ejemplo 1. Clonación del MLA del VHA de la cepa cubana M2.

La secuencia de interés del plásmido pMLA1 se muestra en la Figura 1(A). A partir de la cepa M2 del VHA aislada y caracterizada en Cuba, se purificó el ARN y se amplificó un fragmento de ADN de 6,7 kb mediante la técnica de Transcripción Reversa- Reacción en cadena de la Polimerasa (TR- RCP), utilizando oligonucleótidos específicos (SEQ ID NO 1 y 2 1) para otras secuencias reportadas del VHA. La banda fue clonada en un vector BlueScript (KS+), digerido previamente con la enzima *Sma*I. El plásmido resultante se denominó pMLA1 y se utilizó para la secuenciación nucleotídica del MLA de VHA de la cepa M2 cubana. La secuencia de ADN (SEQ ID NO 3) presenta cambios con respecto a las reportadas que generan 11 cambios aminoacídicos. El análisis de estas secuencias permite clasificar a la cepa M2 dentro del subgenotipo IA, al cual pertenecen casi la totalidad de las cepas americanas. Esta secuencia confirma que la cepa cubana M2 es realmente una cepa del VHA diferente a las anteriormente reportadas.

20 Ejemplo 2. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el citosol de la célula vegetal.

La secuencia de interés del plásmido pP1-2A se muestra en la Figura 1(B). Este plásmido se obtuvo amplificando la secuencia que codifica para las proteínas estructurales (P1-2A) mediante la técnica de RCP, utilizando oligonucleótidos específicos (SEQ ID NO 4) complementarios para las regiones 5' que codifica para la proteína VP4 y la región 3' de la secuencia que codifica para la proteína 2A respectivamente a partir del plásmido pMLA1. La banda amplificada de 2,5 kb (SEQ ID NO 6) se clonó en el vector BlueScript (KS+) digerido *Sma*I

Para la obtención del plásmido p3ABC, cuya secuencia de interés se muestra en la Figura 1 (C), se amplificó mediante RCP la secuencia de 0,2 kb que codifica para la proteína 3A, utilizando oligonucleótidos (SEQ ID NO 7 y 8) complementarios para la región 5' y 3' de este gen y se clonó en un vector BlueScript (KS+), digerido con la enzima *Bam*HI-*Eco*RV. Seguidamente en este mismo vector se clonó en los sitios *Eco*RV-*Xba*I, una secuencia nucleotídica sintética (SEQ ID NO 9 y 10) que codifica para la proteína 3B, obteniéndose el plásmido p3AB. Por otra parte a partir

del plásmido pMLA1, se amplificó mediante RCP, la secuencia de 0,65 kb que codifica para la proteína 3C, donde se utilizaron los oligonucleótidos SEQ ID NO 11 y 12. Esta banda se clonó en el vector P3AB en los sitios *XbaI-HindIII*. Como resultado se obtuvo una secuencia 3ABC (SEQ ID NO 13), que codifica para una poliproteína con actividad proteolítica y sin posibilidades de auto procesamiento debido a que los sitios de corte entre las proteínas 3A/B y 3B/C están mutados, mediante la sustitución de los nucleótidos T por C y G por C respectivamente.

La secuencia de interés del plásmido pMLAm se muestra en la Figura 1(D). Para obtener este plásmido se digirió el plásmido pP1-2A con las enzimas *EcoRI* y *ClaI* y se clonó en este vector la banda de 1 kb codificante para el polipéptido 3ABC mutada, sacada mediante una digestión con las enzimas *EcoRI-ClaI*. Este plásmido contiene la secuencia modificada que codifica para la poliproteína de VHA de una talla significativamente menor a la poliproteína original (SEQ ID NO 14).

El plásmido pKMLAm, se obtuvo clonando la banda MLAm de 3,4 kb, digerida con las enzimas *SmaI-ClaI*, en el vector pKTPL-2, el cual contiene la secuencia promotora 2x 35S del CaMV, la secuencia líder del TEV y el terminador 35S del CaMV. El plásmido pKTPL-2 se digirió con las enzimas *NcoI-Klenow-ClaI*.

La secuencia de interés del plásmido binario pBMLAm se muestra en la Figura 1(F). Este plásmido se obtuvo digiriendo el plásmido pKMLAm con las enzimas *SphI*, y posteriormente tratado con nucleasa *mung bean*, resultando una banda de 4,7 kb que se clonó en el vector binario pBin19, digerido con la enzima *SmaI*.

El plásmido resultante pBMLAm por lo tanto contiene: el gen neomicin fosfotransferasa II (NPT II) el cual codifica para el marcador de selección, la kanamicina; el gen MLAm, que codifica para la poliproteína modificada del VHA, regulado por el promotor 2X 35S, el líder del TEV, el terminador del CaMV y la secuencia nucleotídica de los bordes derecho e izquierdo del T-ADN, por la cual se transfieren estos genes al genoma de la planta.

Ejemplo 3. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el citosol de la célula vegetal.

La secuencia de interés del plásmido p Δ MLAm se muestra en la Figura 2(A). Para eliminar la proteína VP4 y obtener este plásmido, se eliminó el fragmento de 114 pb del plásmido pMLAm cortando con las enzimas *SmaI-PstI* y se sustituyó por la secuencia nucleotídica sintética (SEQ ID NO 15 y 16) que restituye el inicio del gen que codifica para la proteína VP2. La secuencia de la región Δ MLAm corresponde a

la SEQ ID NO 17. El plásmido pK Δ MLAm, se obtuvo clonando la banda Δ MLAm (3,46 kb) digerida con las enzimas *Sma*I-*Cla*I, en el plásmido pKTPL-2 digerido *Nco*I-Klenow-*Cla*I

La secuencia de interés del plásmido binario pB Δ MLAm se muestra en la Figura 2(B), se obtuvo digiriendo el plásmido binario pBin19 con las enzimas *Sma*I y se clonó en este vector un fragmento de ADN de 4,6 kb resultante de la digestión del plásmido pKMLAm con las enzimas *Sph*I y tratado con nucleasa *mung bean*.

El plásmido resultante pB Δ MLAm contiene: el gen neomicin fosfotransferasa II (NPT II) el cual codifica para el marcador de selección, la kanamicina; el gen MLAm, que codifica para la poliproteína modificada del VHA, regulado por el promotor 2X 35S, la secuencia líder del TEV, el terminador 35S del CaMV y la secuencia nucleotídica de los bordes derecho e izquierdo del T-ADN, por la cual se transfieren estos genes al genoma de planta.

Ejemplo 4. Construcciones genéticas para la expresión de envolturas y pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.

La secuencia de interés del plásmido pBVHARE se muestra en la Figura 3B. Para la obtención de este plásmido se clonó el fragmento sintético (SEQ ID NO 18 y 19) que codifica para la señal de retención en el retículo endoplasmático (KDEL), en el vector BS(+) en los sitios *EcoRV*-*Cla*I. Por otra parte en el sitio *Sty*I-*EcoRI* del plásmido pP1-2A se clonó un fragmento sintético (SEQ ID NO 20 y 21) que modifica el extremo 3' de la proteína 2A eliminando el sitio de corte de la proteasa en esta región e introduciendo una secuencia que funciona como espaciador entre la unión del gen y la secuencia que codifica para la señal KDEL. Seguidamente se sacó esta secuencia (2,5 kb) con las enzimas *Sma*I-*EcoRV* y se clonó en el vector BS-KDEL, resultando el plásmido pP1-2ARE (Figura 3A, SEQ ID NO 22). El plásmido p3ABCRE se obtuvo digiriendo el plásmido p3ABC con las enzimas *Xho*I/Klenow-*EcoRI* y clonando la secuencia 3ABC en los sitios *EcoRI*-*EcoRV* (Figura 3A, SEQ ID NO 23).

Para dotar a los genes de interés de señales reguladoras de la expresión en plantas, se clonaron por separados la región estructural P1-2A- KDEL (2,5 kb), extraída del plásmido pP1-2ARE con las enzimas *Sma*I-*Cla*I, en el plásmido pKTPL-2 digerido *Nco*I/Klenow-*Cla*I, resultando el plásmido pKP1-2ARE. La región 3ABC-KDEL de 1 kb se sacó del plásmido p3ABCRE con las enzimas *Nco*I-*Cla*I y se clonó en el plásmido pKTPL-2 digerido con las mismas enzimas, resultando el

plásmido pK3ABCRE. Finalmente, para lograr el plásmido para la transformación de plantas mediante *A. tumefaciens* se digirió el vector binario pBin 19 con la enzima *SaII*, y en este sitio se clonó la secuencia de 2 kb, extraída del plásmido pK3ABCRE, digerido con la enzima *SaII*. Como resultado se obtuvo el plásmido pB3ABCRE. Seguidamente se clonó en este mismo vector, en el sitio *SphI* el casete de expresión correspondiente a la secuencia P1-2A-KDEL, extraído del plásmido pKP1-2ARE, luego de una digestión *SphI*. El plásmido resultante el pBVHARE porta las regiones estructurales y la región con función proteolítica por separadas, fusionadas a la señal de retención en el retículo y bajo las señales de regulación de la expresión en plantas y el gen neomicin fosfotransferasa II (NPT II) el cual codifica para el marcador de selección.

Ejemplo 5. Construcciones genéticas para la expresión de pentámeros en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.

La secuencia de interés del plásmido p Δ VHARE se muestra en la Figura 4B. Para la obtención de este plásmido se digirió el plásmido pP1-2ARE con las enzimas *SmaI-PstI* y se sustituyó este fragmento por la secuencia nucleotídica sintética (SEQ ID NO 15 y 16), restituyéndose el extremo 5' del gen que codifica para la proteína VP2. Este plásmido resultante p Δ P1-2ARE (Figura 4A, SEQ ID NO 24), se digirió *SmaI-ClaI* y se clonó una banda de 2,4 kb en el vector pKTPL-2 digerido *NcoI/K-ClaI*, resultando el plásmido pK Δ P1-2ARE. Seguidamente se clonó en el plásmido pB3ABCRE (el vector binario que contiene la región 3ABC-KDEL), el casete de expresión de 4,5 kb, a partir del plásmido pK Δ P1-2ARE, digerido con la enzima *SphI*,

El plásmido binario resultante contiene: la región estructural sin la secuencia que codifica para la proteína VP4 fusionada a la secuencia que codifica para el péptido KDEL, bajo las señales de regulación de la expresión en plantas; la región 3ABC-KDEL bajo estas mismas señales y el gen neomicin fosfotransferasa II (NPT II) el cual codifica para el marcador de selección.

Ejemplo 6. Obtención de envolturas y pentámeros del VHA en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum*.

La transformación genética de plantas de *Nicotiana tabacum* se llevó a cabo siguiendo el método de Zambryski y colaboradores (1983). Para ello se transformó la cepa AT 2260 (Deblaere y cols., 1985) de *Agrobacterium tumefaciens* por el método del nitrógeno líquido (Hofgen y Willmitzer, 1988) con los plásmidos binarios

desarrollados (p Δ VHARE , pBVHARE, p Δ MLAm, pBMLAm) y con los recombinantes se transformaron discos de hojas de plantas de tabaco de la variedad Petit Havana SR 1, cultivadas *in vitro*. Se empleó Kanamicina (100 mg/L) como marcador de selección del evento de transformación.

- 5 Para comprobar la presencia de los genes de interés introducidos en el genoma de la planta de tabaco y la expresión de estos, así como la formación de envolturas virales o pentámeros se realizaron diferentes procedimientos, tales como, Southern blot, Western blot, ELISA e Inmunomicroscopía.

Ejemplo 7. Obtención de envolturas y pentámeros del VHA en plantas transgénicas de Zanahoria (*Daucus carota* L.)

- 10 Para la transformación de esta planta se utilizaron cepas At 2260 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con los plásmidos binarios (p Δ VHARE , pBVHARE, p Δ MLAm, pBMLAm). Hipocótilos de la variedad New Kuroda, de tres semanas de germinados, se cortaron en segmentos de 1 cm y se plantaron en un
- 15 medio BAN-9 (Murashige Skoog, 1962 (MS), suplementado con NAA a 0,5 mg/L) durante tres días. A continuación se incubaron durante 30 minutos con una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*, conteniendo cada uno de las construcciones anteriormente descritas, y nuevamente se pasaron los explantes al
- 20 medio BAN-9 durante 72 horas. Pasado este tiempo se sembraron en un medio de regeneración suplementado con kanamicina 100 mg/L. Los brotes aparecieron a partir de las 3 semanas y fueron individualizados y plantados en un medio MS, suplementado igualmente con kanamicina a 100 mg/L. La integración de los genes se pudo comprobar mediante un Southern blot de RCP (Figura 6) . La expresión de la poliproteína y su procesamiento y formación de envolturas virales y pentámeros,
- 25 se demostró mediante el ELISA que se muestra en la Figura 8 y el Western blot de la Figura 7.

Ejemplo 8. Obtención de envolturas y pentámeros del VHA en plantas transgénicas de Arroz (*Oryza sativa* L.).

- 30 La transformación genética de plantas de arroz se llevó a cabo siguiendo el método empleado por Hiei y colaboradores (1994). Para ello se transformó la cepa At 2260 de *Agrobacterium tumefaciens* por el método del nitrógeno líquido con los plásmidos binarios desarrollados (p Δ VHARE, pBVHARE, p Δ MLAm, pBMLAm) y con estos recombinantes se transformaron callos obtenidos a partir del escutelo. Se empleó Kanamicina (100 mg/L) como marcador de selección del evento de transformación.

Para comprobar la presencia de los genes de interés introducidos en el genoma de la planta de tabaco y la expresión de estos, así como la formación de envolturas virales o pentámeros se realizaron diferentes procedimientos, los cuales se describen a continuación.

5 **Ejemplo 9. Caracterización molecular e inmunoquímica de las plantas transgenicas. Análisis por Southern blot.**

Para obtener el ADN total, con vista a realizar los análisis de Southern blot en las plantas de tabaco, zanahoria y arroz, se utilizó un método rutinario descrito por Dellaporta y colaboradores (1983). Para el análisis de las muestras se tomaron
10 hojas de plantas transformadas con las construcciones señaladas anteriormente y que mostraban resistencia al marcador de selección. Como controles negativos se utilizaron hojas de plantas no transformadas.

Las digestiones de los ADN purificados, la electroforesis en gel de agarosa, la transferencia del ADN a una membrana Hybond N y la hibridación, se realizaron
15 según está descrito por Sambrook y colaboradores (1989). Un fragmento de ADN de 1,2 kb que incluye el gen que codifica para la proteína VP1 fue marcado con ³²P mediante un Primer-a-Gene Labeling System (Promega Corp., EE.UU.) y usado como sonda radiactiva y como control positivo.

En la Figura 5 se muestra el Southern de plantas transgénicas de tabaco
20 transformadas con las construcciones para la expresión en el citosol de envolturas y pentámeros del VHA (pBΔMLAm, pBMLAm), digeridas *Sma*I y *Cla*I (resultando una banda de 3,4 kb) y en el retículo endoplasmático (pBΔVHARE , pBVHARE), digeridas con las enzimas *Sma*I – *Eco*RI (resultando una banda de 2,4 kb). Los resultados que se muestran en la Figura 5 demuestran que las plantas contienen en
25 su genoma la secuencia que codifican para la proteínas estructurales.

En el caso de las plantas de zanahoria y arroz, se les realizó un Southern al producto de la amplificación mediante la RCP (oligos correspondientes a las secuencias SEQ ID NO 4 y 5). Como se muestra en la Figura 6, se demostró que la secuencia que codifica para la proteína VP1 marcada radiactivamente se
30 complementa con una banda de 2,5 kb, correspondiente a la talla de la secuencia que codifica para las proteínas estructurales.

Análisis por Western blot.

Los resultados del Western blot se muestran en la Figura 7. La inmunodetección de las moléculas recombinantes obtenidas en el ensayo de expresión se realizó mediante Western blot, según la metodología descrita por Towbin y colaboradores (1979). Las muestras para el Western blot consistieron en proteínas totales solubles extraídas de diferentes plantas transgénicas de tabaco, zanahoria y arroz, transformadas con las construcciones que posibilitan la expresión de pentámeros exclusivamente: Los clones, tabaco 5, zanahoria 7 y Arroz 3 transformados con la construcción pBΔVHARE, que posibilita la expresión de los pentámeros en el retículo endoplasmático de estas plantas; y los clones, tabaco 25, zanahoria 10 transformados con la construcción pBΔMLAm, la cual permite la expresión de los pentámeros en el citosol. Como control negativo se usaron hojas de tabaco de plantas no transformadas y como control positivo la proteína VP1 expresada en *E.coli*. Las hojas se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino y se les adicionó 1 mL de tampón de extracción de proteínas [Tris-HCl 61 mM pH 6,8, Triton 0,1%, glicerol 12,5% y Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM] por gramo de hoja, tal como reporta Schouten y colaboradores (1997). El material insoluble se eliminó por centrifugación a 13 000 rpm.

Las proteínas provenientes de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y las proteínas de interés se identificaron utilizando el AcP anti-VP1 conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (PhoA). La expresión de dicha enzima se detectó mediante una reacción colorimétrica.

Los resultados del Western blot se muestran en la Figura 7 y se puede observar la expresión de una proteína de la talla de la proteína VP1 en todos los cultivos, así como otros intermediarios producto del procesamiento incompleto de la poliproteína.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Los resultados del ELISA se muestran en la Figura 8. Se realizaron ensayos tipo "Sandwich". Las placas de inmunoensayo (Maxisorp, Nunc) se recubrieron con 10 µg/mL del AcM 7E7, en tampón carbonato (Na_2CO_3 0,015 M, NaHCO_3 0,028 M, pH

9,6), por 4 horas a 37 °C. Se bloquearon durante 2 horas a 37 °C, con leche descremada al 5% en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) (NaCl 100 mM, Na₂PO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4). Posteriormente se adicionaron 100 µL de las muestras correspondientes a plantas transformadas y no transformadas de tabaco, zanahoria y arroz (preparadas de la misma forma que se describe para el Western blot), se dejaron toda la noche a 4 °C. Se lavó y se adicionaron 100 µL del AcM 7E7 conjugado con fosfatasa alcalina diluído 1/1000 (1 µg/mL) en PBS que contenía leche descremada al 0,5%. La incubación fue a 37 °C por espacio de una hora. La reacción se reveló por adición del sustrato de la enzima 4-nitrofenilfosfato, preparado al 0,1% en Dietanolamina. Se siguió la aparición de color durante 60 minutos. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 405nm en un espectrofotómetro SUMA. Los lavados de la placa en cada etapa del ELISA se realizaro tres veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%.

15 **Análisis por inmunomicroscopía electrónica.**

Los resultados de la inmunomicroscopía se muestran en la Figura 9. Las muestras de tejido de hojas de plantas de tabaco transformada con el plásmido pBMLAm y plantas sin transformar provenientes de cultivo de tejido, se fijaron en una solución de Formaldehído al 4% y posteriormente de Glutaraldehido al 0,2%. Se deshidrataron entonces en etanol y embebieron en una solución de Lowicryl K 4M (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg). Los cortes ultra finos se colocaron en una rejilla de níquel y se incubaron con el AcM 7E7, seguido este paso por la incubación con el AcP anti-IgG de ratón, marcado con partículas de oro coloidal de 15 nm (British Bio-Cell International). Las secciones inmunomarcadas se contrastaron por 5 minutos en Uranilacetato y por 7 minutos en Citrato_de Plomo, antes de ser examinadas al microscopio electrónico de transmisión (Jeol-Jem 2000EX, Japón). Los resultados muestran partículas de aproximadamente 27 nm de diámetros solo en la planta de tabaco transformada con la construcción pBMLAm, mediante la cual se expresa la proteína en el citosol de la célula.

Ejemplo 10. Purificación de envolturas y pentámeros a partir de plantas transgénicas de tabaco y Arroz.

Para la purificación de las envolturas y pentámeros se utilizó un anticuerpo monoclonal anti VHA obtenido en los laboratorios del CIGB, que reconoce exclusivamente las partículas y pentámeros inmunogénicos.

Las proteínas de la célula vegetal fueron extraídas utilizando el protocolo descrito para los análisis por Western blot. El sobrenadante resultante de la centrifugación fue disuelto en cloruro de sodio de 0.5 M y mezclado con el anticuerpo acoplado a un gel (Bio-rad Laboratorios, Richmond, CA) y se incubó por 16 horas a 4 °C. El gel se lavó con 10 volúmenes de PBS (NaCl 100 mM, Na₂PO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4) y seguidamente se eluyó la proteína de interés con 0,2 M de glicina , pH 2,5. Se neutralizó el eluato con Tris básico y se dializó contra PBS. La presencia de partículas de VHA y pentámeros a partir de estos extractos de hojas fueron revelados mediante ELISA, utilizando un monoclonal neutralizante comercial 7E7 (Mediagnost), específico para el reconocimiento de envolturas virales y pentámeros del VHA.

Ejemplo 11. Determinación de la inmunogenicidad de las envolturas y los pentámeros purificados a partir de plantas transgénicas mediante la administración intraperitoneal.

A los ratones blancos ICR de 14 semanas se les suministraron dos dosis de 750 EL.U con envolturas y pentámeros purificados a partir de plantas transgénicas de tabaco y arroz. De la misma forma se inocularon ratones con un antígeno comercial del VHA (Mediagnost), utilizados como control positivo y con PBS (control negativo). Las muestras de sangre se recolectaron los días 0, 15, 30, 50 y 70 post-inoculación.

Los niveles de anticuerpos producidos se midieron mediante un ELISA de inhibición: se recubrió la placa con 5 µg de AcM 7E7 y se incubó la misma durante 4 horas, seguidamente se lavó una vez con PBS-Tween 0,1%. Se bloqueó añadiendo leche descremada al 5%, diluida en PBS Tween 0,1% y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Se lavó la placa 3 veces con PBS- Tween al 0,1%. A continuación se añadieron los sueros de los ratones inmunizados, previamente incubados por 20 min a 37 °C, con antígeno del VHA (Mediagnost). La placa se incubó durante 12 horas a 16 °C y posteriormente se lavó 5 veces con PBS-Tween 0.1%. Finalmente se adicionaron 100 µL del AcM 7E7 conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/1000 en PBS que

contenía leche descremada al 0,5%. La incubación fue a 37 °C durante una hora. La reacción se reveló mediante la adición del sustrato de la enzima 4-nitrofenilfosfato, preparado al 0,1% en dietanolamina. Se siguió la aparición de color durante 60 minutos. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro (SUMA). En la Figura 10 se muestran los niveles promedio de inhibición de los sueros de los ratones inoculados con el antígeno purificado a partir de plantas transgénicas, detectados en sangre de los ratones inmunizados con pentámeros producidos por las plantas de tabaco y arroz. De igual forma se observaron niveles semejantes de anticuerpo en los ratones inmunizados con el antígeno producido de plantas de tabaco y arroz que se transformaron con las construcciones que permiten la expresión de envolturas y pentámeros.

Ejemplo 12. Determinación de la inmunogenicidad de las envolturas y pentámeros purificados a partir de plantas transgénicas mediante la administración oral .

La administración oral del antígeno se realizó por dos vías: utilizando el antígeno purificado y suministrándole a los animales zanahorias que expresan el antígeno. Para la determinación de la antigenicidad mediante la administración oral del envolturas y pentámeros purificados, se les administraron a ratones Balb/c de 8 semanas, pentámeros y envolturas virales durante 8 semanas, en cuatro dosis de 7500 EL.U. Se colectaron 200 µl de sangre a los 0, 15, 30, 50 y 70 días post-inoculación para detectar la presencias de anticuerpos anti VHA, mediante un ELISA de inhibición.

El ELISA de inhibición se realizó mediante el procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 11.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 11, la administración oral de pentámeros del VHA expresados en plantas transgénicas produce respuesta inmunológica lo que se demuestra por los promedios de inhibición de los sueros de los ratones utilizados en el experimento. Los promedios de inhibición de los sueros administrados oralmente son menores al ser comparados con los obtenidos después de la administración intraperitoneal. La administración oral de pentámeros mediante el uso de plantas comestibles, se realizó alimentando a los ratones con 5 g de zanahoria crudas (transformadas con la construcción pBΔMLAm que está

diseñada para que se produzcan solamente pentámeros) una vez a la semana durante cuatros semanas. Como control negativo se utilizaron los sueros de ratones alimentados con zanahorias no transformadas. La capacidad de estas plantas de provocar una respuesta de anticuerpos se demostró mediante un ELISA de inhibición mostrado en la Figura 12.

10 Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB



LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- 5 <120> ANTIGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A
OBTENIDOS EN PLANTAS TRANSGENICAS.
- <130> MLA
- 10 <140>
<141>
- <160> 24
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 25
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<221> primer_bind
25 <222> (1)..(25)
<223> Secuencia # 1.
Secuencia del oligonucleotido # 1, utilizado para
amplificar la secuencia MLA mediante RT-PCR.
- 30 <400> 1
cttaatctag aatgaatatg tccaa 25
- <210> 2
35 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- <220>
40 <221> primer_bind
<222> (1)..(22)
<223> Secuencia # 2.
Secuencia del oligonucleotido #2, utilizado para
amplificar la secuencia MLA mediante RT-PCR.
- 45 <400> 2
gaaagaaata aaggtacctc ag 22
- 50 <210> 3
<211> 6685
<212> ADN
<213> Hepatitis A virus
- 55 <220>
<221> gene
<222> Complement((1)..(6685))
<223> Secuencia # 3.
- 60 Secuencia nucleotídica que codifica para el Marco
de Lectura Abierto (MLA) del VHA de la cepa cubana
M2.

<400> 3

	atgaatatgt	ccaaacaagg	aattttccag	actgttggga	gtggccttga	ccacatcctg	60
	tccttggcag	atattgagga	agagcaaagt	attcagtcog	ttgataggac	tgcaagtgcg	120
	ggagcttctt	atttcacttc	tgtggaccaa	tcttcagttc	atactgctga	ggttggctca	180
5	caccaaattg	aacctttgaa	aacctctgtt	gataaacctg	gttctaagaa	aactcagggg	240
	gagaagtttt	tcttgattca	ttctgctgat	tggctcacta	cacatgctct	ctttcatgaa	300
	gttgcaaaat	tggatgtggg	gaaactgctg	tacaatgagc	agtttgccgt	ccaagggttg	360
	ttgagatacc	atacttatgc	aagatttggc	attgagattc	aagttcagat	aaatcccaca	420
	ccctttcagc	aaggaggact	aatctgtgcc	atgggttcctg	gtgaccaaa	ttatggttca	480
10	atagcatcct	tgactgttta	tcctcatggt	ctgtttaaatt	gcaatatcaa	caatgtagtt	540
	agaataaagg	ttccatttat	ttatactaga	gggtccttatc	attttaaaga	tccacagtac	600
	ccagtttggg	aattgacaat	cagagtttgg	tcagagttga	atattggaac	aggaacctca	660
	gcttatactt	cactcaatgt	tttagctagg	tttacagatt	tggagttgca	tggattaact	720
	cctcttttcta	cacagatgat	gagaaatgaa	tttagagtta	gtactactga	aaatgttgta	780
15	aatttgtcaa	attatgaaga	tgcaagggca	aaaatgtctt	ttgctttgga	tcaggaagat	840
	tggaggtctg	atccttccca	aggtggtgga	attaaaatta	ctcatttcac	tacctggaca	900
	tccattccaa	ccttagctgc	tcagtttoca	ttcaatgctt	cagattcagt	tgggcaacaa	960
	attaaagtta	taccagtggg	cccatacttt	ttccagatga	caaacactaa	tcctgatcaa	1020
	aaatgtataa	cagccttggc	ctctatttgt	cagatgttct	gcttttggag	gggagatcct	1080
20	gttttcgatt	tccaggtttt	tccaacccaa	tatcattcag	gtaggctggt	gttttgtttt	1140
	gttcctggga	atgagttaat	agatgttact	ggaattacat	taaaacaggc	aactactgct	1200
	ccttgtgcag	tgatggacat	tacaggagtg	cagtcaacct	tgagatttcg	tgttccttgg	1260
	atctctgata	caccctatcg	agtgaatagg	tacacgaagt	cagcacatca	aaaaggtgag	1320
	tatactgcc	ttgggaagct	tattgtgtat	tggtataata	gattgacttc	tccttcta	1380
25	gttgcttctc	atgtagaggt	taatgtttat	ctttcagcaa	ttaatttgga	atgttttgc	1440
	cctctttacc	atgctatgga	tgttaccaca	caggttggag	atgattcagg	aggtttctca	1500
	acaacagttt	ctacagagca	gaatgttctc	gatccccaag	ttggcataac	aacctagagg	1560
	gatttaaaag	ggaaagccaa	taggggaaag	atggatgtat	caggagtgca	ggtacctgtg	1620
	ggagctatta	caacaattga	ggatccagtt	ttagcaaa	aagtacctga	gacatttcct	1680
30	gaattgaagc	ctggagaatc	cagacataca	tcagatcaca	tgtctattta	taaattcatg	1740
	ggaaggtctc	atcttctgtg	tacttttact	tttaattcaa	acaataaaga	gtacacattt	1800
	ccaataactc	tgtcttcgac	ttctaactct	cctcatggtt	taccatcaac	attaaggtgg	1860
	ttctttaatt	tgtttcagtt	gtatagagga	ccattggatt	tgacaattat	aatcacagga	1920
	gccactgatg	tggatgggat	ggcctgggtt	actccagtgg	gccttgctgt	cgacaccctt	1980
35	tgggtggaaa	agaagtcagc	tttgtctatt	gattataaaa	ctgcccttgg	agctgttaga	2040
	tttaatacaa	gaagaacagg	gaacattcag	attagattgc	catggatttc	ttatttgtat	2100
	gccgtgtctg	gagcactgga	tggcctggga	gataagacag	attctacatt	tggattgggt	2160
	tctattcaga	ttgcaaatta	caatcattct	gatgaatatt	tgtcctttag	ttgttatttg	2220
	tctgtcacag	agcaatcaga	gttctatttc	cctagagctc	cattaaattc	aaatgctatg	2280
40	ttgtccactg	agtccatgat	gagtagaatt	gcagctggag	acttggagtc	atcagtggtg	2340
	gatcccagat	cagaggagga	cagaagattt	gagagtcata	tagaatgtag	gaaaccatat	2400
	aaagaattga	gactggaggt	tgggaaacaa	agaatcaaat	atgctcagga	agagttatca	2460
	aatgaagtgc	ttccacctcc	taggaaaatg	aagggtttat	tttcacaagc	taaaatttct	2520
	cttttttata	cagaggacca	tgaaaataatg	aaattttctt	ggagaggagt	gactgcta	2580
45	actaggctct	tgagaagatt	tggattctct	ctggctgctg	gtagaagtgt	gtggactcct	2640
	gaaatggatg	ctggagttct	tactggaaga	ttgatcagat	tgaatgatga	gaaatggaca	2700
	gaaatgaagg	atgataagat	tgtttcatta	attgaaaagt	tcacaagcaa	taaacattgg	2760
	tctaaagtga	atcttccaca	tggaaatgtg	gatcttgagg	aaattgctgc	caactctaaa	2820
	gattttccaa	atatgtctga	gacagatttg	tgtttcctgt	tgcattggct	aaatccaaag	2880
50	aaaattaatt	tagcagatag	aatgcttgga	ttgtctggag	tgcaggaaat	taaagaacag	2940
	ggtgttggac	tgatagcaga	gtgtagaact	ttcttggatt	ctatttctgg	gactttgaaa	3000
	tctatgattt	ttgggtttca	ttattctgtg	actgttgaaa	ttataaatat	tgtgtcttgt	3060
	tttattaaga	gtggaatcct	gctttatgtc	atacaacaat	tgaaccaaga	tgaacactct	3120
	cacataaattg	gtttgttgag	agttatgaat	tatgcagata	ttggctgttc	agtcatttca	3180
55	tgtggtaaa	ttttttccaa	aatgttagaa	acagttttta	attggcaa	ggactctaga	3240
	atgatggagc	tgaggactca	gagcttctcc	aatgggttaa	gagatatttg	ttcgggaatt	3300
	actattttta	aaagttttaa	ggatgccata	tattggttat	gtacaaaatt	gaaggatttt	3360
	tatgaagtaa	attatggcaa	gaaaaaggat	gttcttaata	ttctcaaaga	taaccagcaa	3420
	aaaatagaaa	aagccattga	agaagcagac	aatttttgca	ttttgcaa	tcaagatgtg	3480
60	gagaaatttg	atcagtatca	gaaaggggtt	gatttaatac	aaaagctgag	aactgtccat	3540
	tcaatggctc	aagttgaccc	cagtttgggg	gttcatttgt	cacctctcag	agattgcata	3600
	gcaagagtcc	atcaaaagct	caagaatctt	ggatctataa	atcaggccat	ggtaacaaga	3660

	tgtgagccag	ttgtttgcta	tttgtatggc	aaaagagggg	gagggaaaag	cttgacttca	3720
	attgcattgg	caacccaaat	ttgtaaacac	tatggtgttg	aacctgagaa	aaatatttac	3780
	accaaacctg	tggcctcaga	ttattgggat	ggatatagtg	gacaattagt	ttgtattatt	3840
5	gatgatctcg	gccaaaacac	aacagatgaa	gattggctcag	atTTTTgtca	attagtgtca	3900
	ggatgcccaa	tgagattgaa	tatggcttct	cttgaggaga	agggcagaca	tttttcctct	3960
	ccttttataa	tagcatcttc	aaattgggtca	aatccaagtc	caaaaacagt	ttatgtttaa	4020
	gaagcaattg	atcgtaggct	tcatttttaag	gttgaagtta	aacctgcttc	atTTTTtaaa	4080
	aatcctcaca	atgatatgtt	aaatgttaat	ttggctaaaa	caaatgatgc	aattaaagac	4140
10	atgtccttgg	ttgatttgat	aatggatgga	cacaatatatt	cattgatgga	tttacttagt	4200
	tccttagtga	tgacagggtg	aattaggaaa	cagaatatga	gtgaattcat	ggagtgtgtg	4260
	tctcagggaa	tttcagatga	tgacaatgat	agtgcagtag	ctgagttttt	ccggtctttt	4320
	ccatctgggtg	aaccatcaaa	ttccaagtta	tctagttttt	tccaagctgt	cactaatcac	4380
	aagtgggttg	ctgtgggagc	tgcaagtggg	attcctggat	tgctagtggg	aggatggttt	4440
15	gtgtataaag	atTTTTcccg	caaagaggaa	gaaccaattc	cagctgaagg	ggtttatcat	4500
	ggagtgacta	agcccaaaca	agtgattaaa	ttggatgcag	atccagtaga	gtctcagtc	4560
	actctagaaa	tagcaggatt	agttaggaaa	aatTTgggtc	agtttggagt	tggtgagaaa	4620
	aatggatgtg	tgagatgggt	catgaatgcc	ttaggagtga	aggatgattg	gttggttagta	4680
	ccttctcatg	cttataaatt	tgaaaaggat	tatgaaatga	tgaggtttta	tttcaataga	4740
20	ggtggaactt	actattcaat	ttcagctggg	aatggtgtta	ttcaatcttt	agatgtggga	4800
	ttccaagatg	ttgttcta	gaaggttcct	acaattccca	agtttagaga	tattactcaa	4860
	cattttatta	agaaaggaga	tgtgcctaga	gccttgaatc	gcttggcaac	attagtga	4920
	accgttaatg	gaactcctat	gttaatttct	cagggacctt	taaaaatgga	agaaaaagcc	4980
	acttatgttc	ataagaagaa	tgatggtact	acggttgatt	tgactgtaga	tcaggcatgg	5040
25	agaggaaaag	gtgaaggtct	tcctggaatg	tgtggtgggg	ccctagtgtc	atcaaatcag	5100
	tccatacaaaa	atgcaatttt	gggtattcat	gttgctggag	gaaattcaat	tcttgtggca	5160
	aagttgatta	ctcaagaaat	gtttcaaaac	attgataaga	aaattgaaag	tcagagaata	5220
	atgaaagtgg	aatttactca	atgttcaatg	aatgtagtct	ccaaaacgct	ttttagaaa	5280
	agtcccatct	atcaccacat	tgataaaacc	atgattaatt	ttcctgcagc	tatgcctttc	5340
30	tctaaagctg	aaattgatcc	aatggctatg	atgttgtcta	aatattcatt	acctattgtg	5400
	gaagaaccag	aggattacaa	agaagcttca	gttttttacc	aaaataaaat	agtaggcaag	5460
	actcagctag	ttgatgactt	tctagatctt	gatattggcca	ttacaggggc	tccaggcatt	5520
	gatgctatta	atatggattc	atctcctggg	tttcttatg	ttcaagaaaa	attgactaaa	5580
	agagatttga	tttggttgga	tgaaaatggg	ttactgttag	gagttcaccc	aagattggcc	5640
35	cagagaatct	tatttaatac	tgtcatgatg	gaaaattggt	ctgacttaga	tgttgttttt	5700
	acaacttgtc	caaaaagatga	attgagacca	ttagagaaag	ttttggaatc	aaaaacaaga	5760
	gctattgatg	cttgcccttt	ggattataca	atTTtatgtc	gaatgtattg	gggtccagct	5820
	attagttatt	ttcatttgaa	tccagggttt	cacacagggt	ttgctattgg	catagatcct	5880
	gatagacagt	gggatgaatt	atttaaaaca	atgataagat	ttggagatgt	tggtcttgat	5940
40	ttagatTTTT	ctgcttttga	tgccagctct	agtcatttta	tgattaggga	agcaggtaga	6000
	atcatgagtg	aattatctgg	aacaccatct	catttttgaa	cagctcttat	caatactatc	6060
	atTTattcta	aacatctgct	gtacaattgt	tgttatcacg	tctgtgggtc	aatgccttct	6120
	gggtctcctt	gtacagcttt	gttgaaattca	attattaata	atattaattt	gtattatgtg	6180
	ttttctaaaa	tatttgga	gtctccagtt	ttcttttgtc	aagctttgag	gatcctttgt	6240
45	tatggagatg	atgttttgat	agttttttcc	agagatgttc	aaattgataa	tcttgacttg	6300
	attggacaga	aaattgtgga	tgagttcaaa	aaacttgga	tgacagccac	ttcagctgac	6360
	aaaaatgtgc	ctcaactgaa	gccagtttca	gaattgactt	ttcttaaaag	atctttta	6420
	ttggtggagg	acagaatcag	acctgcaatt	tcagaaaaga	caatttggtc	tttgatagct	6480
	tggcagagaa	gtaacgctga	gtttgagcag	aatttagaaa	atgctcagtg	gtttgctttc	6540
50	atgcatggct	atgagttcta	tcagaaattc	tattatTTTg	ttcagtcctg	tttgagaaa	6600
	gagatgatag	aatatagact	taaatcttat	gattgggtga	gaatgagatt	ttatgaccag	6660
	tgTTTTcattt	gtgacctttc	atgat				6685

55 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(40)
 <223> Secuencia # 4.

Secuencia del oligonucleotido #4, utilizado para
amplificar la secuencia P1-2A mediante PCR.

```

5  <400> 4
   ttgaattcag cttgtgaaaa taacccttc attttcctag
                                     40

   <210> 5
   <211> 28
10  <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <221> primer_bind
15  <222> (1)..(28)
   <223> Secuencia # 5.
       Secuencia del oligonucleotido #5, utilizado para
       amplificar la secuencia P1-2A mediante PCR.

20  <400> 5
   cgcccgggtc tagaatgaat atgtccaa
                                     28

   <210> 6
25  <211> 2523
   <212> ADN
   <213> Hepatitis A virus

   <220>
30  <221> gene
   <222> Complement((1)..(2523))
   <223> Secuencia # 6.
       Secuencia nucleotídica codificante para las
       proteínas estructurales (P1-2A) del VHA de la cepa
35  M2

   <400> 6
   atgaatatgt ccaaacaagg aattttccag actggtggga gtggccttga ccacatcctg 60
   tccttggcag atattgagga agagcaaag attcagtcg ttgataggac tgcagtgact 120
40  ggagcttctt atttcacttc tgtggacca tcttcagttc atactgctga gggtgggtca 180
   caccaaattg aacctttgaa aacctctgtt gataaacctg gttctaagaa aactcagggg 240
   gagaagtttt tcttgattca ttctgctgat tggctcacta cacatgctct ctttcatgaa 300
   gttgcaaaat tggatgtggt gaaactgctg tacaatgagc agtttgccgt ccaagggttg 360
   ttgagatacc atacttatgc aagatttggc attgagattc aagttcagat aaatcccaca 420
45  ccctttcagc aaggaggact aatctgtgcc atggttcctg gtgaccaaag ttatggttca 480
   atagcctcct tgactgttta tcctcatggt ctgttaaatt gcaatatcaa caatgtagtt 540
   agaataaagg ttccatttat ttatactaga ggtgcttata attttaaaga tccacagtac 600
   ccagtttggg aattgacaat cagagtttgg tcagagttga atattggaac aggaacctca 660
   gcttatactt cactcaatgt tttagctagg tttacagatt tggagttgca tggattaact 720
50  cctctttcta cacagatgat gagaaatgaa tttagagtta gtactactga aaatggttga 780
   aatttgtcaa attatgaaga tgcaagggca aaaatgtcct ttgctttgga tcaggaagat 840
   tggaagtctg atccttccca aggtggtgga attaaaatta ctcatctcac tacctggaca 900
   tccattccaa ccttagctgc tcagtttcca ttcaatgctt cagattcagt tgggcaacaa 960
   attaaagtta taccagtga cccatacttt ttccagatga caaacactaa tcctgatcaa 1020
55  aaatgtataa cagccttggc ctctatttct cagatgttct gcttttgag gggagatcct 1080
   gttttcgatt tccaggtttt tccaacaaa tatcattcag gtaggctgtt gttttgtttt 1140
   gttcctggga atgagttaat agatgttact ggaattacat taaaacaggc aactactgct 1200
   ccttgtgcag tgatggacat tacaggagtg cagtcaacct tgagatttcg tgttccttgg 1260
   atttctgata caccctatcg agtgaatagg tacacgaagt cagcacatca aaaagggtgag 1320
60  tatactgcca ttgggaagct tattgtgtat tgttataata gattgacttc tccttctaata 1380
   gttgcttctc atgttagagt taatgtttat ctttcagcaa ttaatttggga atgttttgc 1440
   cctctttacc atgctatgga tgttaccaca caggttggag atgattcagg aggttttctca 1500

```

```

acaacagttt ctacagagca gaatgttcct gatccccaag ttggcataac aaccatgagg 1560
gatttaaaag ggaaagccaa taggggaaag atggatgtat caggagtgc ggtacctgtg 1620
ggagctatta caacaattga ggatccagtt ttagcaaaga aagtacctga gacatttcct 1680
5 gaattgaagc ctggagaatc cagacataca tcagatcaca tgtctattta taaattcatg 1740
ggaagggtctc atttcttgtg tacttttact tttaattcaa acaataaaga gtacacattt 1800
ccaataactc tgtcttcgac ttctaatacct cctcatgggt taccatcaac attaagggtg 1860
ttctttaatt tgtttcagtt gtatagagga ccattggatt tgacaattat aatcacagga 1920
gccactgatg tggatgggtat ggcctgggtt actccagtgg gccttgctgt cgacaccct 1980
10 tgggtggaaa agaagtcagc tttgtctatt gattataaaa ctgcccttgg agctgttaga 2040
ttaatacaaa gaagaacagg gaacattcag attagattgc catggatttc ttatttgtat 2100
gccgtgtctg gagcactgga tggtctggga gataagacag attctacatt tggattgggt 2160
tctattcaga ttgcaaatta caatcattct gatgaatatt tgtcctttag ttgttatttg 2220
tctgtcacag agcaatcaga gttctatttc cctagagctc cattaaattc aaatgctatg 2280
15 ttgtccactg agtccatgat gagtagaatt gcagctggag acttgagtc atcagtggat 2340
gatcccagat cagaggagga cagaagattt gagagtcata tagaatgtag gaaaccatat 2400
aaagaattga gactggaggt tgggaaacaa agaatcaa atgctcagga agagttatca 2460
aatgaagtgc ttccacctcc taggaaaatg aaggggttat atgcttctgg aggtgaattc 2520
gat 2523

```

20

```

<210> 7
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

```

25

```

<220>
<221> primer bind
<222> (1)..(27)
<223> Secuencia # 7.

```

30

```

Secuencia del oligonucleotido # 7, utilizado para
amplificar la secuencia 3A mediante PCR.

```

```

<400> 7

```

35

```

ccatgggaat ttcagatgat gacaatg

```

27

```

<210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

```

40

```

<220>
<221> primer bind
<222> (1)..(26)
<223> Secuencia # 8.

```

45

```

Secuencia del oligonucleotido # 8, utilizado para
amplificar la secuencia 3A mediante PCR.

```

```

<400> 8

```

50

```

ggatatcgggt tcttcctctt tgcggg

```

26

```

<210> 9
<211> 85
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

```

55

```

<220>
<221> gene
<222> (1)..(85)
<223> Secuencia # 9.

```

60



<210> 13

<211> 978
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A virus

5 <220>
 <221> gene
 <222> Complement((1)..(978))
 <223> Secuencia # 13.

10 Secuencia correspondiente a la región de la
 poliproteína 3ABC con actividad proteolítica y
 donde los sitios de autoprosesamiento se
 encuentran mutados.

<400> 13

```

15 gaattcctgc agcccgggg atccatggga atttcagatg atgacaatga tagtgcagta 60
   gctgagtttt tccggtcttt tccatctggt gaaccatcaa attccaagtt atctagtttt 120
   ttccaagctg tcaactaatca caagtgggtt gctgtgggag ctgcagttgg tattcttgga 180
   ttgctagtgg gaggatggtt tgtgtataag catttttccc gcaaagagga agaaccaatt 240
   ccagctgttg gggtttatca tggagtgact aagcccaaac aagtgattaa attggatgca 300
20 gatccagtag agtctcagtt gactctagaa atagcaggat tagttaggaa aaatttggtt 360
   cagtttgagag ttggtgagaa aaatggatgt gtgagatggg tcatgaatgc cttaggagtg 420
   aaggatgatt ggttggttagt accttctcat gcttataaat ttgaaaagga ttatgaaatg 480
   atggagtttt atttcaatag aggtggaact tactattcaa tttcagctgg taatgttggt 540
   attcaatctt tagatgtggg attccaagat gttgttctaa tgaaggttcc tacaattccc 600
25 aagtttagag atattactca acattttatt aagaaaggag atgtgcctag agccttgaat 660
   cgcttgacaa cattagtgc aaccgttaat ggaactccta tgttaatttc tgagggacct 720
   ttaaaaatgg aagaaaaagc cacttatggt cataagaaga atgatggtac tacgggtgat 780
   ttgactgtag atcaggcatg gagaggaaaa ggtgaaggtc ttcctggaat gtgtggtggg 840
   gccctagtgt catcaaatca gtccatacaa aatgcaattt tgggtattca tgttgctgga 900
30 ggaaattcaa ttcttggtggc aaagttgatt actcaagaaa tgtttcaaaa cattgataag 960
   aaaattgaaa tcaagctt                                     978

```

<210> 14
 35 <211> 3489
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A virus

<220>
 40 <221> gene
 <222> Complement((1)..(3489))
 <223> Secuencia # 14.

Secuencia nucleotídica que codifica para el nuevo
 Marco de Lectura Abierto modificado (MLAm) de la
 cepa cubana M2 del VHA,

<400> 14

```

   atgaatatgt ccaaacaagg aattttccag actgttggga gtggccttga ccacatcctg 60
   tccttggcag atattgagga agagcaaatg attcagtcctg ttgataggac tgcagtgcact 120
50 ggagcttctt atttcacttc tgtggaccaa tcttcagttc atactgctga ggttggtcctca 180
   caccaaattg aacctttgaa aacctctggt gataaacctg gttctaagaa aactcagggg 240
   gagaagtttt tottgattca ttctgctgat tggctcacta cacatgctct ctttcatgaa 300
   gttgcaaaat tggatgtggt gaaactgctg tacaatgagc agtttgccgt ccaaggtttg 360
   ttgagatacc atacttatgc aagatttggtc attgagattc aagttcagat aaatcccaca 420
55 ccctttcagc aaggaggact aatctgtgcc atggttcctg gtgaccaaag ttatggttca 480
   atagcatcct tgactgttta tcctcatggt ctgttaaatt gcaatatcaa caatgtagtt 540
   agaataaagg ttccatttat ttatactaga ggtgcttatc attttaaaga tccacagtac 600
   ccagtttggg aattgacaat cagagtttgg tcagagttga atattggaac aggaacctca 660
   gcttatactt cactcaatgt tttagctagg tttacagatt tggagttgca tggattaact 720
60 cctctttota cacagatgat gagaaatgaa tttagagtta gtactactga aaatgttgta 780
   aatttgtcaa attatgaaga tgcaagggca aaaatgtctt ttgctttgga tcaggaagat 840
   tggaagtctg atccttccca aggtggtgga attaaaatta ctcatctcac tacctggaca 900

```

```

tccattccaa ccttagctgc tcagtttcca ttcaatgctt cagattcagt tgggcaacaa 960
attaaagtta taccagtggg cccatacttt ttccagatga caaacactaa tcctgatcaa 1020
aaatgtataa cagccttggc ctctatttgt cagatgttct gcttttggag gggagatctt 1080
gttttcgatt tccaggtttt tccaaccaa tatcattcag gtaggctgtt gttttgtttt 1140
5 gttcctggga atgagttaat agatgttact ggaattacat taaaacaggc aactactgct 1200
ccttgtgcag tgatggacat tacaggagtg cagtcaacct tgagatttcg tgttccttgg 1260
atctctgata caccctatcg agtgaatagg tacacgaagt cagcacatca aaaaggtgag 1320
tatactgcca ttgggaagct tattgtgtat tgttataata gattgacttc tccttctaata 1380
10 gttgcttctc atgttagagt taatgtttat ctttcagcaa ttaatttggg atgttttggc 1440
cctctttacc atgctatgga tgttaccaca caggttggag atgattcagg aggtttctca 1500
acaacagttt ctacagagca gaatgttcct gatccccaag ttggcataac aacctagagg 1560
gatttaaaag ggaaagccaa taggggaaag atggatgtat caggagtgcg ggtacctgtg 1620
ggagctatta caacaattga ggatccagtt ttagcaaaga aagtacctga gacatttcct 1680
15 gaattgaagc ctggagaatc cagacataca tcagatcaca tgtctattta taaattcatg 1740
ggaaggtctc atttcttgtg tacttttact ttaattcaa acaataaaga gtacacattt 1800
ccaataactc tgtcttcgac ttctaatacct cctcatgggt taccatcaac attaaggtgg 1860
ttctttaatt tgtttcagtt gtatagagga ccattggatt tgacaattat aatcacagga 1920
gccactgatg tggatgggtat ggcctgggtt actccagtgg gccttgctgt cgacaccctt 1980
20 tgggtggaaa agaagtcagc tttgtctatt gattataaaa ctgcccttgg agctgttaga 2040
tttaatacaa gaagaacagg gaacattcag attagattgc catgggtattc ttatttgtat 2100
tccgtgtctg gagcactgga tggcctggga gataagacag attctacatt tggattgggt 2160
tctattcaga ttgcaaatta caatcattct gatgaatatt tgtcctttag ttgttatttg 2220
25 tctgtcacag agcaatcaga gttctatttc cctagagctc cattaaattc aaatgctatg 2280
ttgtccactg agtccatgat gagtagaatt gcagctggag acttggagtc atcagtggtg 2340
gatcccagat cagaggagga cagaagattt gagagtcata tagaatgtag gaaacctatg 2400
aaagaattga gactggagggt tgggaaacaa agaatcaaat atgctcagga agagttatca 2460
aatgaagtgc ttccacctcc taggaaaatg aaggggttat tttcacaagc tgaattcctg 2520
cagcccgggg gatccatggg aatttcagat gatgacaatg atagtgcagt agctgagttt 2580
30 ttccggtctt ttccatctgg tgaaccatca aattccaagt tatctagttt tttccaagct 2640
gtcactaatc acaagtgggt tgctgtggga gctgcagttg gtattcttgg attgctagtg 2700
ggaggatggg ttgtgtataa gcatttttcc cgcaaagagg aagaaccaat tccagctgtt 2760
ggggtttatc atggagtga taagcccaaa caagtgatta aattggatgc agatccagta 2820
gagtctcagt tgactctaga aatagcagga ttagttagga aaaatttggg tcagtttggg 2880
35 gttggtgaga aaaatggatg tgtgagatgg gtcatgaatg ccttaggagt gaaggatgat 2940
tggttgtagg taccttctca tgcttataaa tttgaaaagg attatgaaat gatggagttt 3000
tatttcaata gaggtggaac ttactattca atttcagctg gtaatgttgt tattcaatct 3060
ttagatgtgg gattccaaga tgttgttcta atgaaggttc ctacaattcc caagttttaga 3120
gatattactc aacattttat taagaaagga gatgtgccta gagccttgaa tcgcttggca 3180
40 acattagtga caaccgttaa tggaaactcct atgttaattt ctgagggacc tttaaaaatg 3240
gaagaaaaag ccacttatgt tcataagaag aatgtatggt ctacggttga tttgactgta 3300
gatcaggcat ggagaggaaa aggtgaaggt cttcctggaa tgtgtgggtg ggcctagtg 3360
tcatcaaadc agtccatata aaatgcaatt ttgggtattc atgttgctgg aggaaattca 3420
attcttgtgg caaagttgat tactcaagaa atgtttcaaa acattgataa gaaaattgaa 3480
45 atcaagctt 3489

```

<210> 15

<211> 51

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> gene

<222> (1)..(51)

55 <223> Secuencia # 15.

Fragmento sintético que restituye el inicio de la transcripción de la proteína VP2.

<400> 15

60 gggatggata ttgaggaaga gcaaagatt cagtcggtt ataggactgc a

51

<210> 16
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(47)
 <223> Secuencia # 16.

10

Fragmento sintético que restituye el inicio de la transcripción de la proteína VP2 (cadena complementaria).

<400> 16

15

gtcctatcaa cggactgaat catttgctct tcctcaatat ccatccc

47

<210> 17
 <211> 3426
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A virus

20

<220>
 <221> gene
 <222> Complement((1)..(3426))
 <223> Secuencia # 17.

25

Secuencia que codifica para el nuevo Marco de Lectura Abierto modificado (DMLAm) de la cepa cubana M2 del VHA. Esta secuencia no tiene el gen que codifica para la proteína VP4.

30

<400> 17

35

gggatggata	ttgaggaaga	gcaaatgatt	cagtcctgtg	ataggactgc	agtgactgga	60
gcttcttatt	tcacttctgt	ggaccaatct	tcagttcata	ctgctgaggt	tggctcacac	120
caaattgaac	ctttgaaaac	ctctgttgat	aaacctggtt	ctaagaaaac	tcagggggag	180
aagtttttct	tgattcattc	tgctgattgg	ctcactacac	atgctctctt	tcatgaagtt	240
gcaaaattgg	atgtggtgaa	actgctgtac	aatgagcagt	ttgccgtcca	aggtttgttg	300
agataccata	cttatgcaag	atgtggcatt	gagattcaag	ttcagataaa	tcccacaccc	360
tttcagcaag	gaggactaat	ctgtgccatg	gttcctggtg	accaaagtta	tggttcaata	420
gcatccttga	ctgtttatcc	tcatggctctg	ttaaattgca	atatcaacaa	tgtagttaga	480
ataaaggttc	cattttattta	tactagaggt	gcttatcatt	ttaaagatcc	acagtaccca	540
gtttgggaat	tgacaatcag	agtttggtca	gagttgaata	ttggaacagg	aacctcagct	600
tatacttcac	tcaatgtttt	agctaggttt	acagatttgg	agttgcatgg	attaactcct	660
ctttctacac	agatgatgag	aaatgaattt	agagttagta	ctactgaaaa	tgttgtaaat	720
ttgtcaaatt	atgaagatgc	aagggcaaaa	atgtcttttg	ctttggatca	ggaagattgg	780
aagtctgata	cttcccaagg	tggtggaatt	aaaattactc	atcttactac	ctggacatcc	840
attccaacct	tagctgctca	gtttccattc	aatgcttcag	attcagttgg	gcaacaaatt	900
aaagttatac	cagtggaacc	atactttttc	cagatgacaa	acactaatcc	tgatcaaaaa	960
tgtataacag	ccttggcctc	tatttgtcag	atgtttctgt	tttggagggg	agatcttggt	1020
ttcgatttcc	aggtttttcc	aaccaaatat	cattcaggta	ggctgttggt	ttgttttggt	1080
cctgggaatg	agttaataga	tgttactgga	attacattaa	aacaggcaac	tactgtcctc	1140
tgtgcagtga	tggacattac	aggagtgcag	tcaaccttga	gatttcgtgt	tccttggatt	1200
tttgatacac	cctatcgagt	gaataggtac	acgaagtcag	cacatcaaaa	aggtgagtat	1260
actgccattg	ggaagcttat	tgtgtattgt	tataatagat	tgacttctcc	ttctaattgt	1320
gcttctcatg	ttagagttaa	tgtttatctt	tcagcaatta	atgtggaatg	ttttgtcctc	1380
ctttaccatg	ctatggatgt	taccacacag	gttggagatg	attcaggagg	tttctcaaca	1440
acagtttcta	cagagcagaa	tgttcctgat	ccccagttg	gcataacaac	catgagggat	1500
ttaaaaggga	aagccaatag	gggaaagatg	gatgtatcag	gagtgacagg	acctgtggga	1560
gctattacaa	caattgagga	tccagtttta	gcaaagaaag	tacctgagac	atctcctgaa	1620
ttgaagcctg	gagaatccag	acatacatca	gatcacatgt	ctattttataa	attcatggga	1680
aggtctcatt	tcttgtgtac	ttttactttt	aattcaaaca	ataaagagta	cacatttcca	1740
ataactctgt	cttcgacttc	taatcctcct	catggtttac	catcaacatt	aaggtggttc	1800

60

```

ttaaatttgt ttcagttgta tagaggacca ttggatttga caattataat cacaggagcc 1860
actgatgtgg atggtatggc ctggtttact ccagtgggcc ttgctgtcga cacccttgg 1920
gtggaaaaga agtcagcttt gtctattgat tataaaactg cccttggagc tgttagattt 1980
aatacaagaa gaacagggaa cattcagatt agattgccat ggtattctta tttgtatgcc 2040
5 gtgtctggag cactggatgg cttgggagat aagacagatt ctacatttgg attggtttct 2100
attcagattg caaattacaa tcattctgat gaattttgt cctttagtgt ttatttgtct 2160
gtcacagagc aatcagagtt ctatttccct agagctccat taaattcaaa tgctatgttg 2220
tccactgagt ccatgatgag tagaattgca gctggagact tggagtcac agtggatgat 2280
cccagatcag aggaggacag aagatttgag agtcatatag aatgtaggaa accatataaa 2340
10 gaattgagac tggaggttgg gaaacaaaga atcaaataatg ctcaggaaga gttatcaaat 2400
gaagtgttc cactcctag gaaaatgaag gggttatttt cacaagctga attcctgcag 2460
cccgggggat ccatgggaat ttcagatgat gacaatgata gtgcagtagc tgagtttttc 2520
cggctctttc catctggtga accatcaaat tccaagttat ctagtttttt ccaagctgtc 2580
actaatcaca agtgggttgc tgtgggagct gcagttggta ttcttggatt gctagtggga 2640
15 ggatggtttg tgtataagca tttttccgc aaagaggaag aaccaattcc agctgttggg 2700
gtttatcatg gactgactaa gcccaaaca gtgattaaat tggatgcaga tccagtagag 2760
tctcagttga ctctagaaat agcaggatta gttaggaaaa atttggttca gtttggagtt 2820
ggtgagaaaa atggatgtgt gagatgggtc atgaatgcct taggagtga ggatgattgg 2880
20 ttgttagtac cttctcatgc ttataaattt gaaaaggatt atgaaatgat ggagttttat 2940
ttcaatagag gtggaactta ctattcaatt tcagctggta atgttgttat tcaatcttta 3000
gatgtgggat tccaagatgt tgttctaatt aaggttccta caattcccaa gtttagagat 3060
attactcaac attttattaa gaaaggagat gtgcctagag ccttgaatcg cttggcaaca 3120
ttagtgacaa ccgttaatgg aactcctatg ttaatttctg agggaccttt aaaaatggaa 3180
35 gaaaaagcca cttatgttca taagaagaat gatggtacta cggttgattt gactgtagat 3240
caggcatgga gagggaaagg tgaaggctct cctggaatgt gtggtggggc cctagtgtca 3300
25 tcaaatcagt ccatacaaaa tgcaattttg ggtattcatg ttgctggagg aaattcaatt 3360
cttgtggcaa agttgattac tcaagaaatg tttcaaaaca ttgataagaa aattgaaatc 3420
aagctt 3426

```

30

```

<210> 18
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

```

35

```

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(19)
<223> Secuencia # 18.

```

40

Fragmento sintético que corresponde a la secuencia nucleotídica de la señal de retención en el retículo endoplasmático (KDEL).

45

```

<400> 18
atcaaggatg aattgtaat

```

19

50

```

<210> 19
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

```

55

```

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(21)
<223> Secuencia # 19.
Fragmento sintético que corresponde a la secuencia nucleotídica de la señal de retención en el retículo endoplasmático (KDEL).

```

60

```

<400> 19
cgattacaat tcataccttga t

```

21

```

5  <210> 20
   <211> 55
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <221> D_segment
10  <222> (1)..(54)
   <223> Secuencia # 20
       Fragmento sintético que modifica el extremo 3' de
       la proteína 2A introduce un espaciador entre ésta
       y la señal KDEL.
15
   <400> 20
   cctaggaaaa tgaaggggtt atatgcttct ggaggtgaat tcgatatcaa ggatg      55

20  <210> 21
   <211> 54
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

25  <220>
   <221> D_segment
   <222> (1)..(54)
   <223> Secuencia # 21.
       Fragmento sintético que modifica el extremo 3' de
30  la proteína 2A introduce un espaciador entre ésta
       y la señal KDEL.

   <400> 21
35  aattcatcct tgatatcgaa ttcacctcca gaagcatata accccttcat ttcc      54

   <210> 22
   <211> 2555
   <212> ADN
40  <213> Hepatitis A virus

   <220>
   <221> gene
   <222> Complement((1)..(2555))
45  <223> Secuencia # 22.
       Secuencia que codifica para las proteínas
       estructurales (P1-2A) unidas a la señal de
       retención en el retículo endoplasmático.

50  <400> 22
   atgaatatgt ccaaacaagg aatthttccag actggtggga gtggccttga ccacatcctg 60
   tccttggcag atattgagga agagcaaag attcagtcctg ttgataggac tgcagtgact 120
   ggagcttctt atttcacttc tgtggaccaa tcttcagttc atactgctga ggttgggtca 180
   caccaaattg aacctttgaa aacctctggt gataaacctg gttctaagaa aactcagggg 240
55  gagaagtttt tcttgattca ttctgctgat tggctcacta cacatgctct ctttcatgaa 300
   gttgcaaat tggatgtggt gaaactgctg tacaatgagc agtttgcoct ccaagggttg 360
   ttgagatacc atacttatgc aagatttggc attgagattc aagttcagat aaatcccaca 420
   ccctttcagc aaggaggact aatctgtgcc atgggttcctg gtgaccaaag ttatgggttca 480
   atagcatcct tgactgttta tcctcatggt ctgttaaatt gcaatatcaa caatgtagtt 540
60  agaataaagg ttccatthtat ttatactaga ggtgcttatt attttaaaga tccacagtac 600
   ccagtttggg aattgacaat cagagtttgg tcagagttga atattggaac aggaacctca 660
   gcttatactt cactcaatgt tttagctagg ttacagatt tggagttgca tggattaact 720

```

```

cctcttttcta cacagatgat gagaaatgaa tttagagtta gtactactga aaatgttgta 780
aatttggtcaa attatgaaga tgcaagggca aaaatgtctt ttgctttgga tcaggaagat 840
tggaagtctg atccttccca aggtgggtgga attaaaaatta ctcatctcac tacctggaca 900
tccattccaa ccttagctgc tcagtttcca ttcaatgctt cagattcagt tgggcaacaa 960
5 attaaagtta taccagtgga cccatacttt ttccagatga caaacactaa tcctgatcaa 1020
aaatgtataa cagccttggc ctctatctgt cagatgttct gcttttggag gggagatctt 1080
gttttcgatt tccaggtttt tccaaccaa tatcattcag gtaggtgtt gttttgtttt 1140
gttcctggga atgagttaat agatgttact ggaattacat taaaacaggc aactactgct 1200
ccttgtgcag tgatggacat tacaggagtg cagtcaacct tgagatttcg tgttccttgg 1260
10 atttctgata caccctatcg agtgaatagg tacacgaagt cagcacatca aaaaggtgag 1320
tatactgcca ttgggaagct tattgtgtat tgttataata gattgacttc tccttctaatt 1380
gttgcttctc atgttagagt taatgtttat ctttcagcaa ttaatttga atgttttgct 1440
cctctttacc atgctatgga tgttaccaca caggttggag atgattcagg aggtttctca 1500
acaacagttt ctacagagca gaatgttcct gatccccaag ttggcataac aacctgagg 1560
15 gatttaaaag ggaaagccaa taggggaaag atggatgtat caggagtgc ggtacctgtg 1620
ggagctatta caacaattga ggatccagtt ttagcaaaga aagtacctga gacatttcct 1680
gaattgaagc ctggagaatc cagacataca tcagatcaca tgtctattta taaattcatg 1740
ggaaggtctc atttcttgtg tacttttact tttaattcaa acaataaaga gtacacattt 1800
ccaataactc tgtcttcgac ttctaatacct cctcatgggt taccatcaac attaaggtgg 1860
20 ttctttaatt tgtttcagtt gtatagagga ccattggatt tgacaattat aatcacagga 1920
gccactgatg tggatggat ggctgggtt actccagtg gccttgctgt cgacaccct 1980
tgggtggaaa agaagtcagc tttgtctatt gattataaaa ctgcccttgg agctgttaga 2040
tttaatacaa gaagaacagg gaacattcag attagattgc catgggtattc ttatttgtat 2100
gccgtgtctg gagcactgga tggttggga gataagacag attctacatt tggattgggt 2160
25 tctattcaga ttgcaaatta caatcattct gatgaatatt tgtcctttag ttgttatttg 2220
tctgtcacag agcaatcaga gttctatttc cctagagctc cattaaattc aaatgctatg 2280
ttgtccactg agtccatgat gagtgaatt gcagctggag acttggagtc atcagtggt 2340
gatcccatg cagaggagga cagaagattt gagagtcata tagaatgtag gaaaccatat 2400
aaagaattga gactggaggt tgggaaacaa agaatcaa atgctcagga agagttatca 2460
30 aatgaagtgc ttccacctcc taggaaaatg aaggggttat atgcttctgg aggtgaattc 2520
gatatcaagg atgaattgta atcgataccg tcgac 2555

```

```

<210> 23
35 <211> 1012
    <212> ADN
    <213> Hepatitis A virus

```

```

40 <220>
    <221> gene
    <222> Complement((1)..(1012))
    <223> Secuencia # 23.
        Secuencia que codifica para la poliprotina 3ABC y
        la señal de retención en el retículo
45 endoplasmático.

```

```

<400> 23
gaattcctgc agcccggggg atccatggga atttcagatg atgacaatga tagtgcagta 60
gctgagtttt tccggtcttt tccatctggt gaaccatcaa attccaagtt atctagtttt 120
50 ttccaagctg tcactaatca caagtgggtt gctgtgggag ctgcagttgg tattcttgga 180
ttgctagtgg gaggatgggt tgtgtataag catttttccc gcaaagagga agaaccaatt 240
ccagctgttg gggtttatca tggagtgact aagcccaaac aagtgattaa attggatgca 300
gatccagtag agtctcagtt gactctagaa atagcaggat tagttaggaa aaatttgggt 360
cagtttggag ttggtgagaa aaatggatgt gtgagatggg tcatgaatgc cttaggagtg 420
55 aaggatgatt ggttgttagt acctctcat gcttataaat ttgaaaagga ttatgaaatg 480
atggagtttt atttcaatag aggtggaact tactattcaa tttcagctgg taatgttgtt 540
attcaatctt tagatgtggg attccaagat gttgttctaa tgaaggttcc tacaattccc 600
aagtttagag atattactga acattttatt aagaaaggag atgtgcctag agccttgaat 660
cgcttggcaa cattagtgc aaccgttaat ggaactccta tgtaatttc tgagggacct 720
60 ttaaaaatgg aagaaaaagc cacttatgtt cataagaaga atgatggtac tacggttgat 780
ttgactgtag atcaggcatg gagaggaaaa ggtgaaggtc ttcctggaat gtgtgggtgg 840
gccctagtgt catcaaata gtccatacaa aatgcaattt tgggtattca tgttgctgga 900

```

ggaaattcaa ttcttgtggc aaagttgatt actcaagaaa tgtttcaaaa cattgataag 960
 aaaattgaaa tcaagcttcg acctcgaatc aaggatgaat tgtaatcgat ac 1012

5 <210> 24
 <211> 2492
 <212> ADN
 <213> Hepatitis A virus

10 <220>
 <221> gene
 <222> Complement((1)..(2492))
 <223> Secuencia que codifica para la región estructural,
 exceptuando a la proteína VP4, fusionada a la
 15 señal de retención en el retículo endoplasmático.

<400> 24
 gggatggata ttgaggaaga gcaaattgatt cagtcctgtt ataggactgc agtgactgga 60
 gcttcttatt tcacttctgt ggaccaatct tcagttcata ctgctgaggt tggctcacac 120
 20 caaattgaac ctttgaaaac ctctgttgat aaacctgggt ctaagaaaac tcagggggag 180
 aagtttttct tgattcattc tgctgattgg ctactacac atgctctctt tcatgaagtt 240
 gcaaaattgg atgtggtgaa actgctgtac aatgagcagt ttgccgtcca aggtttgttg 300
 agataccata cttatgcaag atttggcatt gagattcaag ttcagataaa tcccacaccc 360
 tttcagcaag gaggactaat ctgtgccatg gttcctgggt accaaagtta tggttcaata 420
 25 gcatccttga ctgtttatcc tcatggctctg ttaaattgca atatcaacaa tgtagttaga 480
 ataaagggttc cttttattta tactagaggt gcttatcatt ttaaagatcc acagtaccca 540
 gtttggaat tgacaatcag agtttgggtca gagttgaata ttggaacagg aacctcagct 600
 tatacttcac tcaatgtttt agctagggtt acagatttgg agttgcatgg attaaactcct 660
 ctttctacac agatgatgag aaatgaattt agagttagta ctactgaaaa tgttgtaaat 720
 30 ttgtcaaatt atgaagatgc aagggcaaaa atgtcttttg ctttggatca ggaagattgg 780
 aagtctgatc cttcccaagg tgggtggaatt aaaattactc atttcactac ctggacatcc 840
 attccaacct tagctgtcga gtttccattc aatgcttcag attcagttgg gcaacaaatt 900
 aaagtattac cagtggaccc atacttttcc cagatgacaa acactaatcc tgatcaaaaa 960
 tgtataacag ccttggcctc tatttgtcag atgttctgct tttggagggg agatcttgtt 1020
 35 ttcgatttcc aggtttttcc aaccaaatat cattcaggta ggctgttgtt ttgttttgtt 1080
 cctgggaatg agttaataga tgttactgga attacattaa aacaggcaac tactgtcctt 1140
 tgtgcagtga tggacattac aggagtgcag tcaaccttga gatttctgtt tccttggatt 1200
 tctgatacac cctatcgagt gaataggtag acgaagtcag cacatcaaaa aggtgagtag 1260
 actgccattg ggaagcttat tgtgtattgt tataatagat tgacttctcc ttctaattgtt 1320
 40 gcttctcatg ttagagttaa tgtttatctt tcagcaatta atttggaatg ttttgctcct 1380
 ctttaccatg ctatggatgt taccacacag gttggagatg attcaggagg tttctcaaca 1440
 acagtttcta cagagcagaa tgttctgtat cccaagttg gcataacaac catgagggat 1500
 ttaaaagga aagccaatag gggaaagatg gatgtatcag gagtgcaggt acctgtggga 1560
 gctattacaa caattgagga tccagtttta gcaaagaaag tacctgagac atttcctgaa 1620
 45 ttgaagcctg gagaatccag acatacatca gatcacatgt ctatttataa attcatggga 1680
 aggtctcatt tcttgtgtac ttttactttt aattcaaaaa ataaagagta cacatttcca 1740
 ataactctgt cttcgacttc taatcctcct catggtttac catcaacatt aaggtggttc 1800
 ttttaattgt ttcagttgta tagaggacca ttggatttga caattataat cacaggagcc 1860
 actgatgtgg atggtatggc ctggtttact ccagtgggcc ttgctgtcga cacccttgg 1920
 50 gtggaaaaga agtcagcttt gtctattgat tataaaaactg cccttggagc tgttagattt 1980
 aatacaagaa gaacaggga cattcagatt agattgccat ggtattctta tttgtatgcc 2040
 gtgtctggag cactggatgg cttgggagat aagacagatt ctacatttgg attgggttct 2100
 attcagattg caaattacaa tcattctgat gaattttgt ccttttagttg ttatttgtct 2160
 gtcacagagc aatcagagtt ctatttccct agagctccat taaattcaaaa tgctatgttg 2220
 55 tccactgagt ccatgatgag tagaattgca gctggagact tggagtcac agtggtatg 2280
 cccagatcag aggaggacag aagattttgag agtcaatatg aatgtaggaa accatataaa 2340
 gaattgagac tggaggttgg gaaacaaaga atcaaatatg ctcaggaaga gttatcaaat 2400
 gaagtgcctc cacctcctag gaaaatgaag gggttatatg cttctggagg tgaattcgat 2460
 atcaaggatg aattgtaatc gataccgtcg ac 2492

60



REIVINDICACIONES

ANTIGENOS RECOMBINANTES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS A OBTENIDOS EN CELULAS VEGETALES

5

1. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A caracterizado porque son obtenidos en células vegetales a partir de construcciones genéticas que contienen genes quiméricos del VHA basados en fragmentos modificados del genoma SEQ ID NO 3.

10

2. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene solamente pentámeros.

3. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 1 y 2 caracterizado porque se obtienen a partir de la expresión de un gen quimérico según la SEQ ID NO 17 que contiene la fusión de los elementos siguientes:

15

a. Un secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas VP2, VP3, VP1 y 2A SEQ ID NO 25

b. Un secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas 3A, 3B, 3C, Seq. Id No.13

20

4. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 3 caracterizado porque el gen quimérico se expresa en células vegetales regulado por señales promotoras y de terminación apropiadas.

5. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 4 caracterizado porque se obtienen en el citosol de la célula vegetal.

25

6. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 5 caracterizado porque se expresan en plantas dicotiledóneas.

7. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 6 caracterizado porque se expresa en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles.

30

8. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 5 caracterizado porque se expresa en plantas monocotiledóneas.

9. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 8 caracterizado porque se expresa en arroz y en frutos de plantas comestibles.

10. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 1 caracterizado porque contiene pentámeros y envolturas vacías.

35

11. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 10 caracterizado porque se obtuvo a partir de la expresión de un gen quimérico que contiene la fusión de los dos elementos siguientes:

- a. Una secuencia nucleotídica según la SEQ ID NO 6 que codifica para las proteínas VP4, VP2, VP3, VP1 y 2A.
- b. Una secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas 3A, 3B, 3C, según la reivindicación 3b.

- 5 12. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 11 caracterizado porque el gen quimérico se expresa en la célula vegetal regulado por señales promotoras y de terminación apropiadas.
- 13. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 12 caracterizado porque se obtienen en el citosol de la célula vegetal.
- 10 14. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 13 caracterizado porque se obtienen en plantas dicotiledóneas.
- 15. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 14 caracterizado porque se expresa en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles.
- 15 16. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 13 caracterizado porque se expresa en plantas monocotiledóneas.
- 17. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 16 caracterizado porque se expresa en arroz y en frutos de plantas comestibles.
- 20 18. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 2 caracterizado porque se obtienen a partir de la expresión coordinada de dos genes quiméricos:
 - a. Una secuencia nucleotídica, según la SEQ ID NO 24 que codifica para las proteínas VP2, VP3, VP1, 2A, fusionada en su extremo 5' a una secuencia señal y por su extremo 3' a una secuencia espaciadora seguido de la secuencia que codifica para el péptido KDEL.
 - 25 b. Una secuencia nucleotídica, según la SEQ ID NO 23 que codifica para las proteínas 3A, 3B, 3C, referidas en la reivindicación 3b, fusionadas en su extremo 5' a una secuencia señal y por su extremo 3' a una secuencia espaciadora seguido de la secuencia que codifica para el péptido KDEL.
- 30 19. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 18 caracterizado porque los genes quiméricos se expresan en la célula vegetal regulados por señales promotoras y de terminación apropiadas.
- 20. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 18 y 19 caracterizado porque se obtienen en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.
- 35 21. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 20 caracterizado porque se obtienen en plantas dicotiledóneas.

22. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 21 caracterizado porque se obtienen en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles
23. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 20 caracterizado porque se obtienen en plantas monocotiledóneas.
24. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 23 caracterizado porque se obtienen en arroz. y en frutos de plantas comestibles
25. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 10 caracterizado porque se obtienen a partir de la expresión coordinada de dos genes quiméricos:
- a. Un secuencia nucleotídica, según la SEQ ID NO 22 que codifica para las proteínas VP4, VP2, VP3, VP1, 2A, fusionada en su extremo 5' a una secuencia señal y por su extremo 3' a una secuencia espaciadora y seguido de la secuencia que codifica para el péptido KDEL.
 - b. Un secuencia nucleotídica, según la reivindicación 18 b.
26. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 25 caracterizados porque los genes quiméricos se expresan en la célula vegetal regulados por señales promotoras y de terminación apropiadas.
27. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 25 y 26 caracterizados porque se obtienen en el retículo endoplasmático de la célula vegetal.
28. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 27 caracterizados porque se obtienen en plantas dicotiledóneas.
29. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 28 caracterizados porque se obtienen en tabaco, zanahoria y en frutos de plantas comestibles
30. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 27 caracterizados porque se obtienen en plantas monocotiledóneas.
31. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 30 caracterizados porque se obtienen en arroz. y en frutos de plantas comestibles
32. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales pueden ser purificados para ser administrados por vía parenteral.
33. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 32 que puede ser administrado en combinación con otros antígenos virales.
34. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales pueden ser administrados por vía oral.

35. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 34 los cuales pueden ser administrados en forma de extracto liofilizado, tableta o cápsula

36. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales pueden ser administrados en forma de jugo.

37. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según las reivindicaciones 1, 3, 11, 18 y 25 los cuales son inmunogénicos y levantan respuesta inmune protectora contra la hepatitis A.

38. Antígenos recombinantes del virus de la Hepatitis A según la reivindicación 32, los cuales pueden ser utilizados como parte de un sistema diagnóstico de la hepatitis A.

39. Uso de los antígenos según las reivindicaciones 1 a la 38 para preparar composiciones vacunales simples y combinadas.

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB



Figura 1

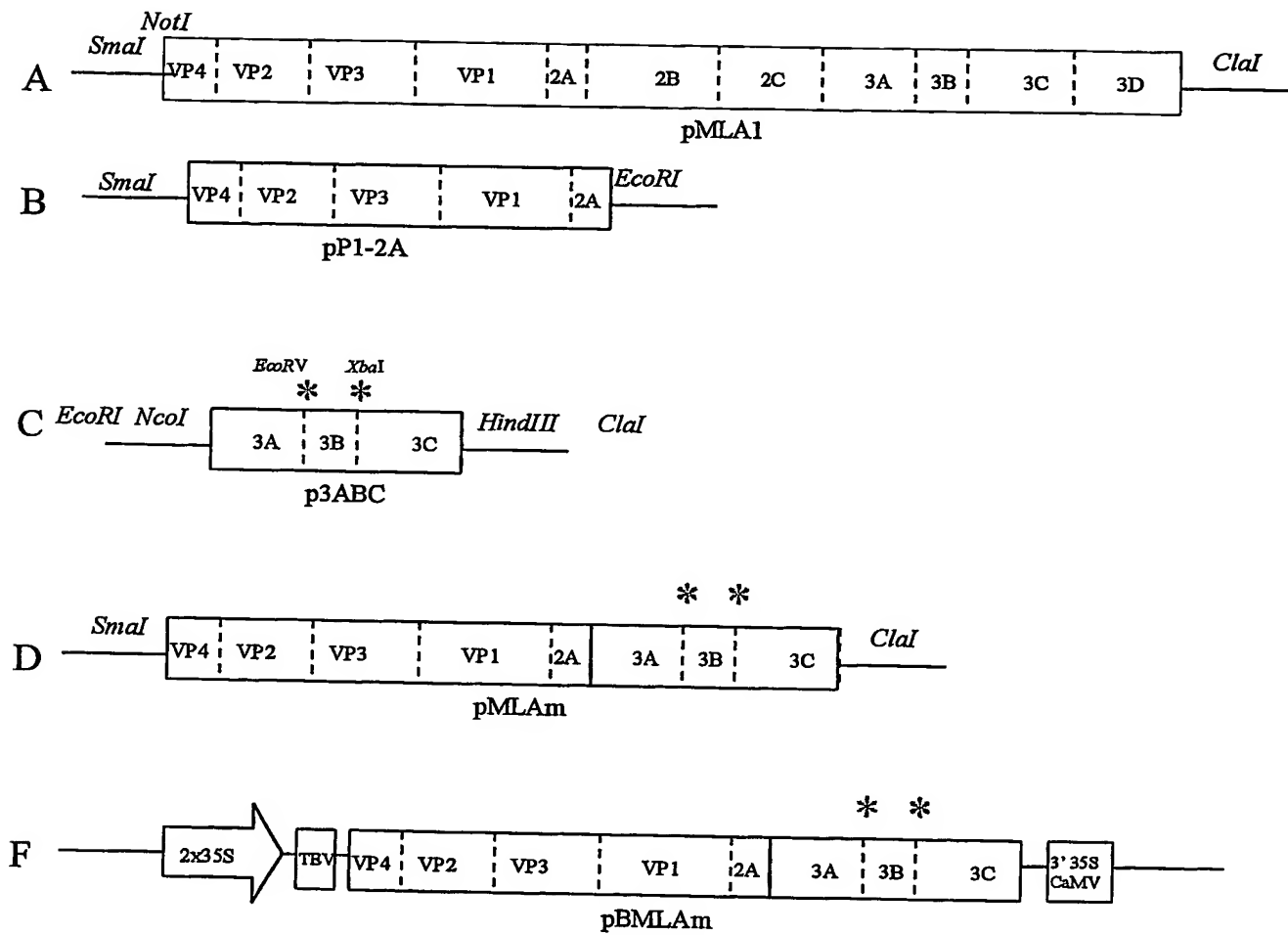
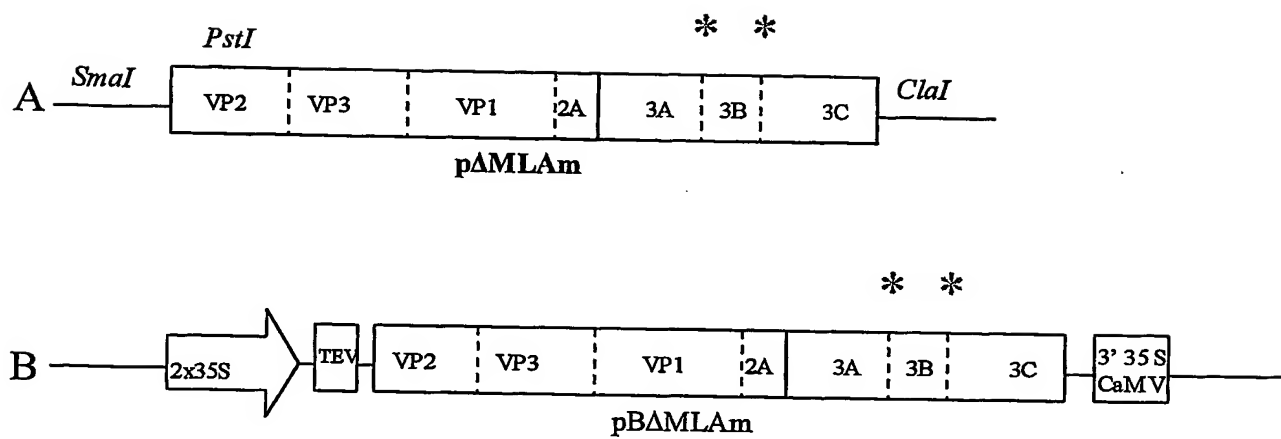


Figura 2



Handwritten signature and circular stamp of the Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Figura 3

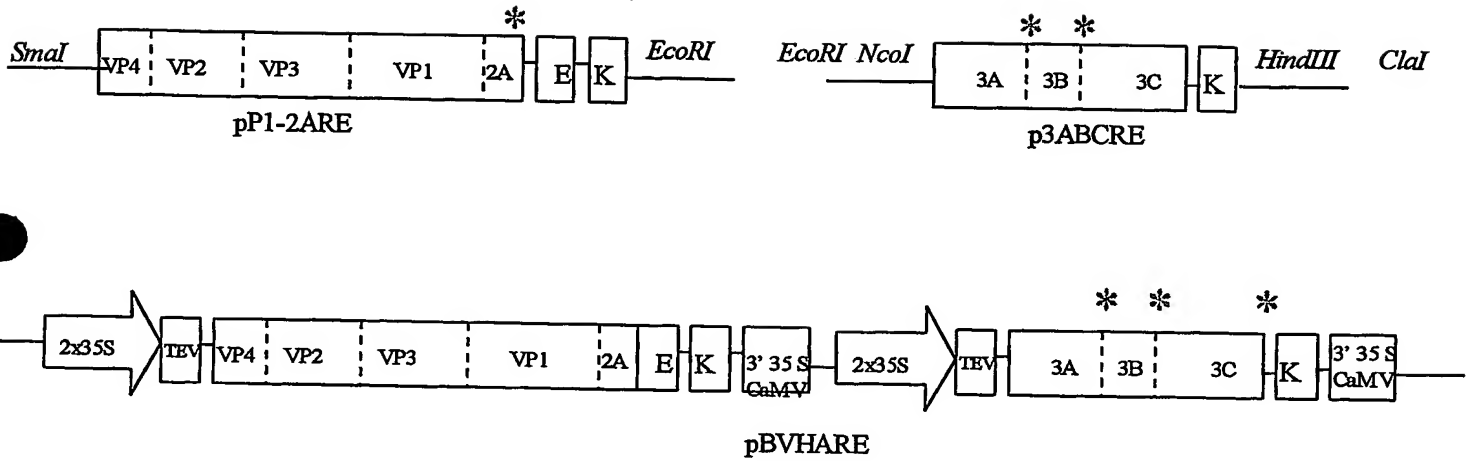


Figura 4

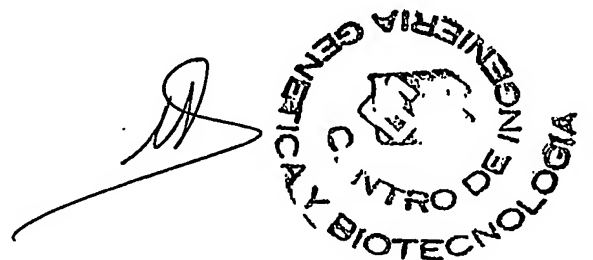
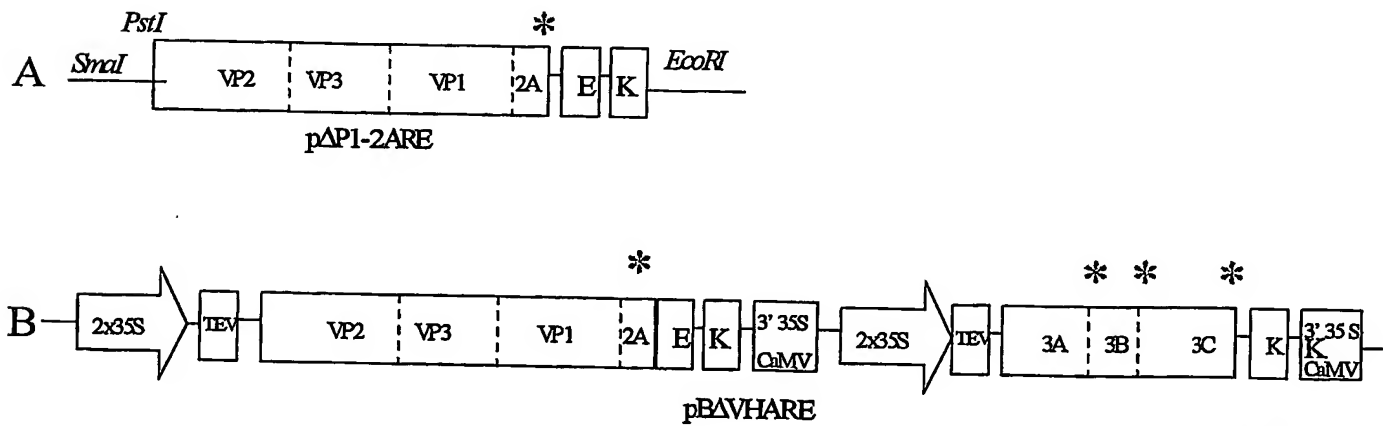


Figura 5

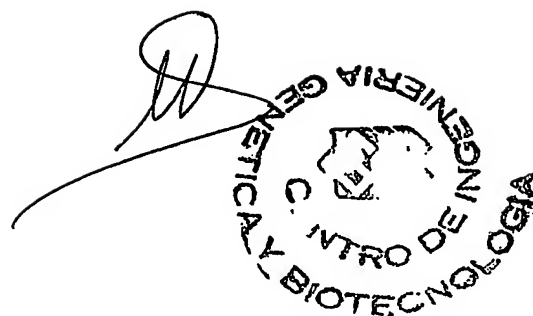
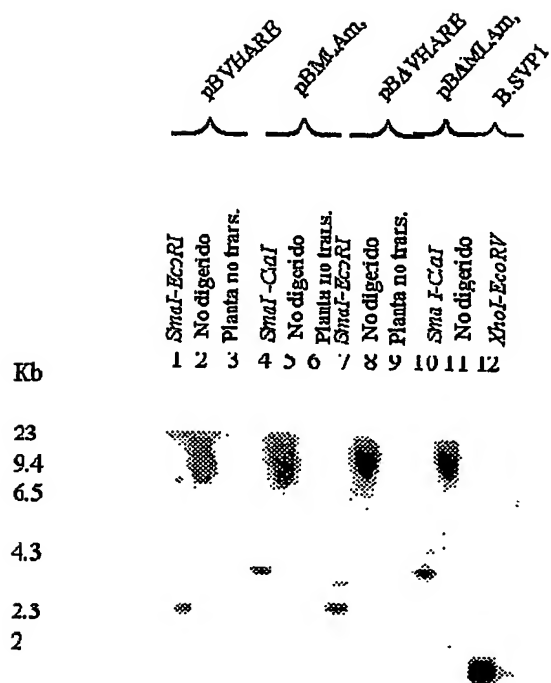
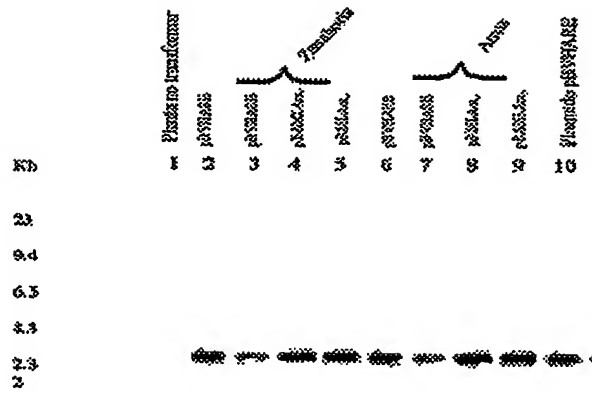


Figura 6




 CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Figura 7

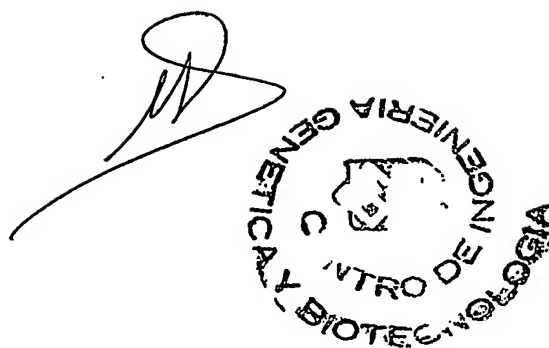
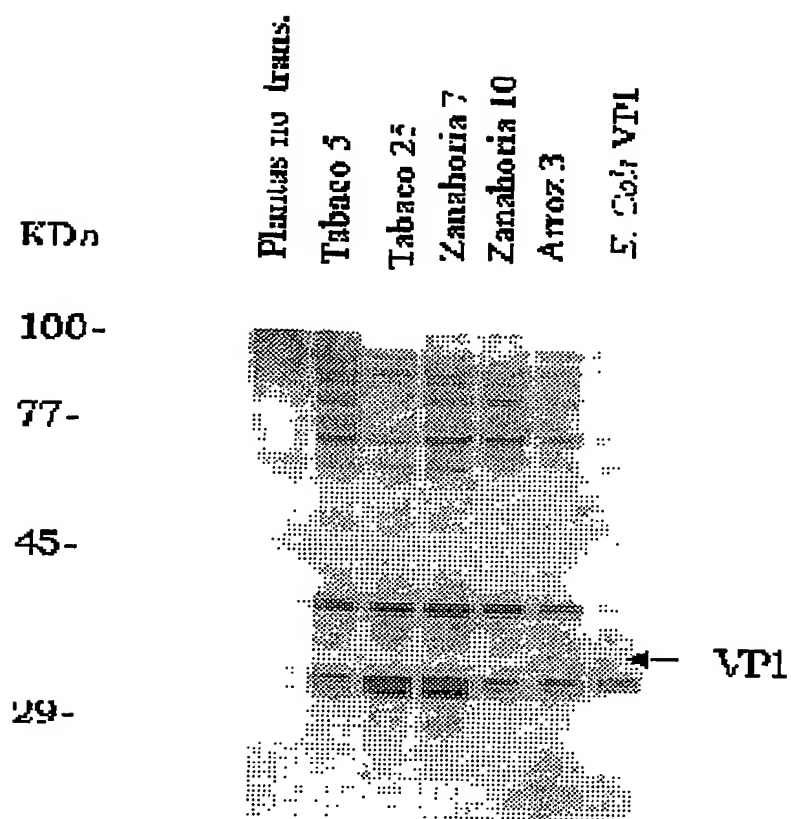


Figura 8

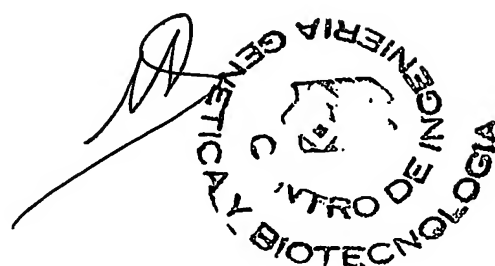
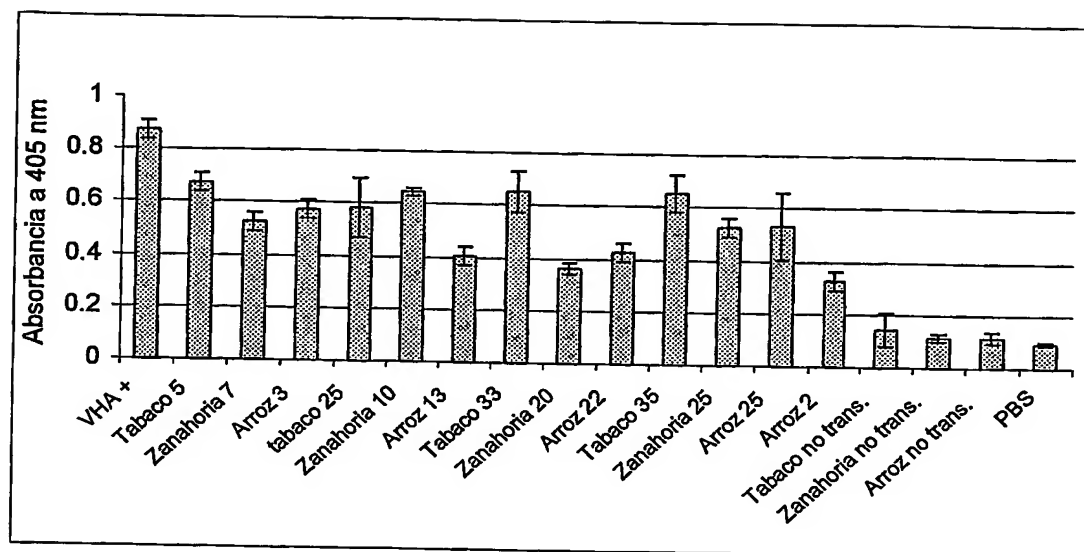
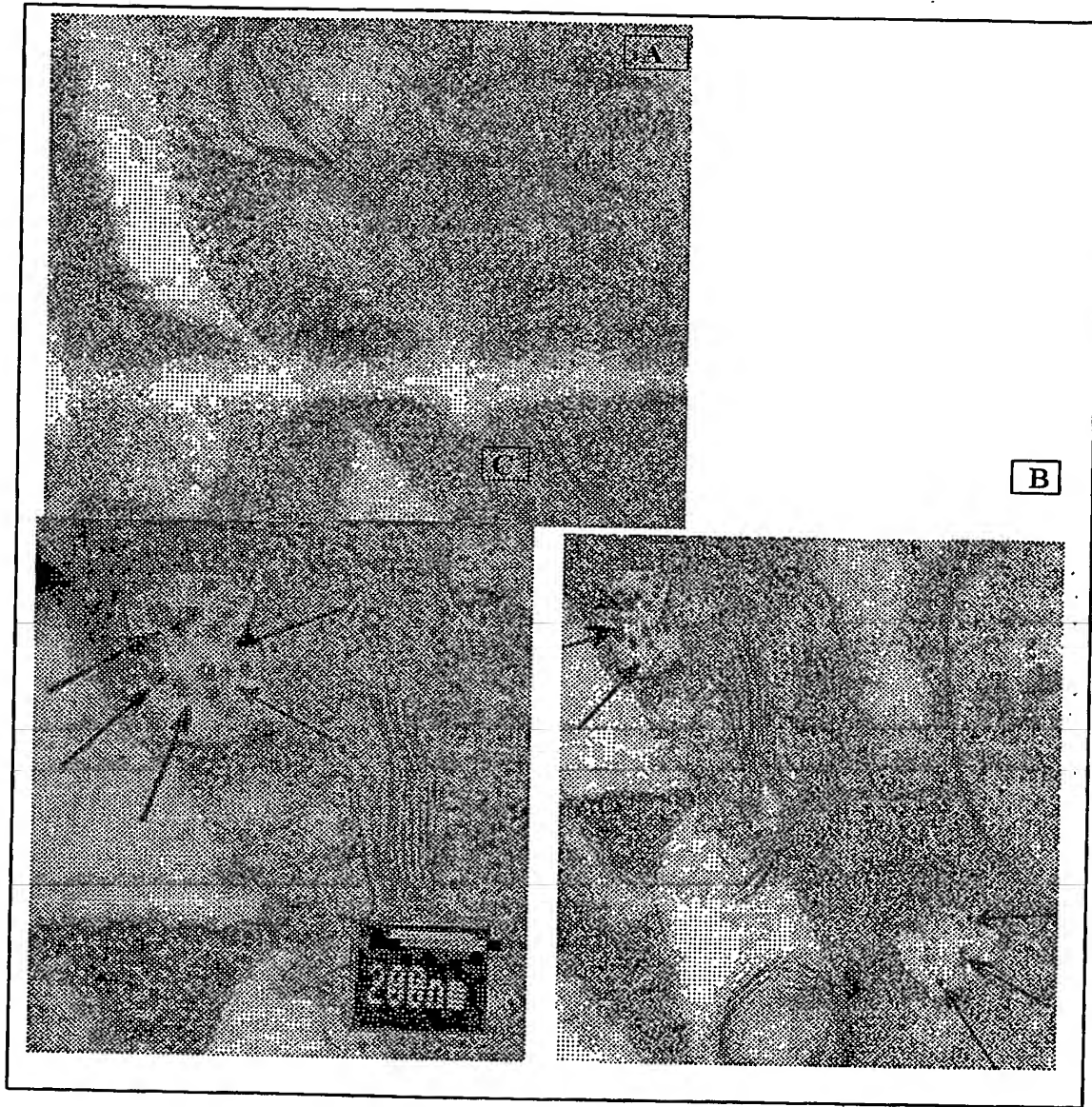


Figura 9




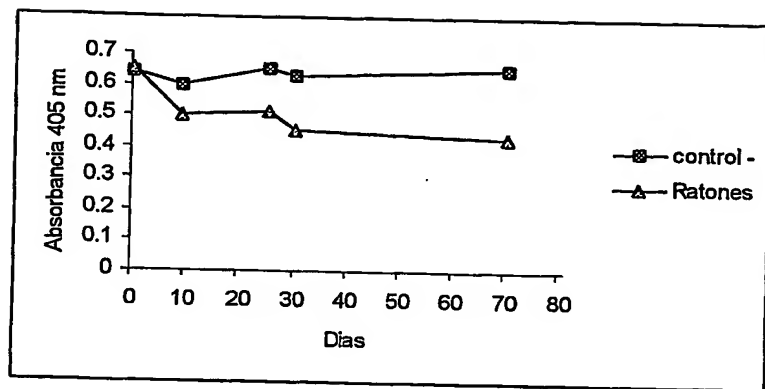

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Figura 12



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.